

Analyse der Interaktion zwischen antiviralen CD8⁺ T-Zellen und der Evolution des Hepatitis C Virus

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Marianne Ruhl

aus Mönchengladbach

Dezember 2011

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Jörg Timm

2. Gutachter: Prof. Karl Lang

3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Daniel Hoffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Hepatitis C Virus	2
1.1.1	Das HCV-Genom	2
1.1.2	Aufbau des Polyproteins und der Replikationsverlauf	3
1.1.3	Modellsysteme <i>in vitro</i>	7
1.2	Die HCV-Genotypen und die Virusdynamik	10
1.3	Pathogenese der HCV-Infektion	11
1.3.1	Klinik, Verlauf und Therapie	11
1.4	Die Ostdeutsche Anti-D Kohorte	13
1.5	Die Immunantwort bei einer HCV-Infektion	13
1.5.1	Die angeborene Immunantwort	13
1.6	Die adaptive Immunantwort	15
1.6.1	Die humorale Immunantwort	15
1.6.2	Die zelluläre Immunantwort	16
1.6.2.1	Prozessierung und Präsentation von Antigenen	17
1.6.3	Versagen der CD8 ⁺ T-Zellantwort durch verschiedene Mechanismen	19
1.6.4	„Escape“-Mutationen durch Selektionsdruck des Immunsystems	20
1.7	Ziel der Promotionsarbeit	21
2	Material und Methoden	24
2.1	Substanzen und Lösungen	24
2.1.1	Reagenzien und Feinchemikalien	24
2.2	Zellkulturmedien und Zusätze	25
2.3	Verbrauchsmaterialien	26
2.4	Enzyme	27
2.5	Kommerzielle Kits	27
2.6	Geräte	28

2.7	Computerprogramme und Internetseiten	28
2.8	Oligonukleotide	29
2.9	Peptide	30
2.10	Bakterienstämme	31
2.11	Virusisolate	31
2.12	Plasmide und Vektoren	34
2.12.1	pFK-I ₃₄₁ PI-Luc/NS3-3'/Con1/ET	34
2.12.2	Kommerzielle Vektoren	35
2.12.2.1	Vektor pAcGFP-HCV-Flu-A2 Epitop-HCV	36
2.13	Humane Zelllinie	37
2.13.1	Humane Hepatomzelllinie Huh7	37
2.13.2	Lunet-Zellen	37
2.14	Lösungen und Puffer	38
2.15	Zellbiologische Methoden	39
2.15.1	Aufbereitung von peripherem Vollblut aus Serum- und EDTA-Monovetten	39
2.15.2	Isolierung der PBMC aus peripherem Vollblut	39
2.15.3	Kryokonservierung von Zellen	40
2.15.4	Kultivierung von Huh7-Zellen	40
2.15.5	Transfektion von Huh7-Zellen durch die Elektroporation	41
2.15.6	Transfektion von PBMCs durch die Elektroporation	41
2.16	Molekularbiologische Methoden	42
2.16.1	Isolation von DNA	42
2.16.1.1	Patientenblut	42
2.16.2	Isolation von RNA	42
2.16.2.1	Serum	42
2.16.3	Qualitative RT-PCR	42
2.16.3.1	Analyse von HCV-Fragmenten	42
2.16.4	Aufreinigung von DNA Fragmenten	43

2.16.5	Agarosegelelektrophorese und Agarosegelextraktion von DNA Fragmenten	43
2.16.6	Klonierung von PCR- Produkten in den Vektor pCR 2.1 TOPO	43
2.16.7	Zielgerichtete Mutagenese (SDM)	44
2.16.8	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i>	44
2.16.8.1	Transformation von kompetenten XL-gold Zellen	44
2.16.8.2	Transformation von Top10-Zellen	44
2.16.9	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	45
2.16.10	Restriktion und Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA	45
2.16.10.1	Linearisierung von Plasmid-DNA vor der <i>in vitro</i> -Transkription von HCV-Replikon-RNA	45
2.16.10.2	Phenol/Chloroform-Aufreinigung von Plasmid-DNA	45
2.16.10.3	<i>In vitro</i> -Transkription zur Herstellung von HCV-Plasmid-RNA	45
2.17	Luziferase-Assay	46
2.18	Immunologische Methoden	46
2.18.1	Durchflußzytometrie	46
2.18.2	Färbung von Oberflächenproteinen	47
2.18.3	Intrazelluläre Zytokinfärbung	47
2.19	Sequenzanalysen	48
2.19.1	Sequenzierungen	48
2.19.2	Erstellung phylogenetischer Bäume	48
2.20	Statistische Analysen	48
3	Ergebnisse	53
3.1	Der Einfluss von HLA-Klasse I-assoziiertem Immundruck auf die Evolution von HCV in der Anti-D Kohorte	53
3.1.1	Phylogenetische Analyse der HCV-Sequenzen aus der Anti-D Kohorte	53
3.1.2	Evolutionäre Entwicklung der Anti-DSequenzen im Vergleich zur HCV-Konsensussequenz des Genotyps 1b	57

3.1.3	Die Virusevolution in den einzelnen Nicht-Strukturproteinen	59
3.1.4	Die Verteilung der HLA-Allele in der Anti-D Kohorte	60
3.1.5	Die Virusevolution in individuellen CD8-Epitopen	61
3.1.6	Die Evolutionsrate von synonymen und nicht-synonymen Mutationen innerhalb bekannter CD8-Epitope	63
3.1.7	Identifizierung neuer potentieller CD8-Epitope	66
3.1.7.1	Identifizierung von Epitop-Kandidaten aufgrund statistischer Analysen	66
3.1.7.2	Bestätigung neuer CD8-Epitope durch den immunologischen Nachweis	69
3.1.7.3	Nachweis des immunologischen „ <i>Escape</i> “ der selektierten Epitop-Varianten	72
3.1.8	Nachweis des Selektionsdrucks in CD8-Epitopen mit HLA-B-Allel-Restriktion	75
3.2	Einfluss von „ <i>Escape</i> “-Mutationen auf die virale Fitness	77
3.2.1	Mutationen in der Region der HLA-B*15-restringierten CD8 ⁺ T-Zell-Epitope in NS5B	77
3.2.2	Nachweis des kompensatorischen Effekts der K2440Q-Mutation	80
3.3	Die Auswirkung von Substitutionen auf spezifische CD8-Epitope und der Antigen-Prozessierung	82
3.3.1	Etablierung eines Systems zum Nachweis endogen prozessierter CD8-Epitope	83
4	Diskussion	89
4.1	Der Einfluss von HLA-Klasse I-assoziiertem Immundruck auf die Evolution von HCV in der Anti-D Kohorte	89
4.2	Der Einfluss der „ <i>Escape</i> “-Mutationen auf die virale Fitness des Hepatitis C Virus	94
4.3	Die Auswirkung von Substitutionen auf spezifische CD8-Epitope und die Antigen-Prozessierung	96
5	Zusammenfassung	99
5.1	Deutsch	99

5.2	Englisch	101
6	Literaturverzeichnis	103
7	Abkürzungsverzeichnis	116
7.1	Einheiten	119
8	Anhang	120
8.1	Publikationen	123
8.2	Abbildungsverzeichnis	124
8.3	Tabellenverzeichnis	126
8.4	Danksagung	127
8.5	Lebenslauf	128
8.6	Erklärungen	130

1 Einleitung

Epidemiologischen Schätzungen zufolge sind weltweit bis zu 170 Millionen Menschen von einer chronischen Hepatitis C betroffen. Dies entspricht in etwa 2-3 % der Weltbevölkerung. Jährlich infizieren sich 3-4 Millionen Menschen (WHO 2011) mit dem Hepatitis C Virus (HCV). Während es bei einem geringen Prozentsatz der mit HCV infizierten Patienten zu einer spontanen Ausheilung kommen kann, entwickeln hingegen 50-80 % einen chronischen Krankheitsverlauf, der zur Entwicklung einer Leberzirrhose führen kann, verbunden mit dem Risiko eines hepatozellulären Karzinoms (Perz et al. 2006). Hepatitis C zählt somit zu einer der Hauptursachen für Lebertransplantationen (Brown et al. 2005).

Eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung dieser unterschiedlichen Krankheitsverläufe spielt das Immunsystem. Die genaue Bedeutung der einzelnen Komponenten des Immunsystems für diese unterschiedlichen Verläufe der Infektion ist allerdings noch immer unzureichend verstanden. Sowohl Wirtsfaktoren als auch virale Faktoren spielen bei dem Versagen der Immunantwort, mit der Folge der Chronifizierung der HCV-Infektion, eine Rolle. In diesem Zusammenhang sind die hohe Mutationsrate des Virus und die Selektion von Mutationen in Zielantigenen der adaptiven Immunantwort von besonderem Interesse.

Eine chronische HCV-Infektion wird aktuell mit pegyliertem Interferon alpha (PEG-IFN α) und dem Nukleosidanalogen Ribavirin (RBV) therapiert. Allerdings wird eine dauerhafte Ausheilung durch diese Kombinationstherapie, abhängig von dem Genotyp (GT) des Virus, nur bei 50-80 % der Patienten erreicht (Zeuzem et al. 2004). Die schnelle Anpassungsform von HCV erschwert die Entwicklung neuer Therapien und Vakzine. Wichtige Fortschritte in der Entwicklung von Zellkultursystemen haben die Entwicklung neuer direkt antiviral aktiver Medikamente ermöglicht. In aktuellen Studien führt z.B. die zusätzliche Behandlung mit Telaprevir, einem Proteaseinhibitor, zu einer weitaus höheren Ausheilungsrate (Foster et al. 2011). Trotz der Fortschritte in der Zellkultur gibt es weiterhin kein geeignetes Tiermodell für immunologische Fragestellungen, sodass auf diesem Gebiet viele offene Fragen verbleiben.

1.1 Das Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus gehört zur Familie der Flaviviridae und wird der Gattung des Hepacivirus zugeordnet. Das Virus besteht aus einer ikosaedrischen Partikelform mit einem Durchmesser von 40-50 nm und ist von einer Membranhülle umgeben. Die Hüllmembran des Virus besteht bei der Familie der Flaviviren aus Glykoproteinen E1 und E2. Die E2-Glykoproteine bilden Homodimere und sind von E1-Proteinen flankiert. Von der Hüllmembran wird das sphärische Kapsid umschlossen, in dessen Inneren das RNA-Genom lokalisiert ist (Abbildung 1.1).

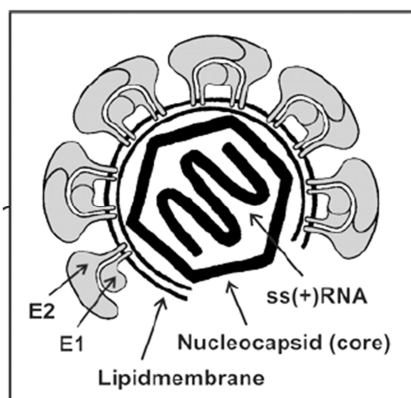


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Viruspartikels. Die Hüllproteine E1 und E2 umgeben das Kapsid, in dem sich die einzelsträngige RNA befindet (Bartenschlager et al. 2004).

1.1.1 Das HCV-Genom

Das HCV-Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA und hat eine Länge von 9,6 kb. Die RNA liegt in einer Plusstrangorientierung vor und kodiert einen offenen Leserahmen (ORF) von ca. 3000 Aminosäuren. Die RNA besitzt keine Cap-Gruppe und wird an den 5'- und 3'-Enden von nichttranslatierten Nukleotidregionen (NTR) flankiert. Die 5'-NTR des Genoms besteht aus etwa 340 Basen und sowohl die Sequenz als auch die Sekundärstruktur sind hochkonserviert. Innerhalb der 5'-NTR befindet sich die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), wodurch die Translation des Polyproteins initiiert wird. Das 3'-NTR übernimmt wahrscheinlich wichtige Funktionen während der Genomreplikation bei der Initiation der RNA-Negativstränge (Cheng und Tsai 1999; Yanagi et al. 1999).

1.1.2 Aufbau des Polyproteins und der Replikationsverlauf

Das Genom kodiert für ein Polyprotein, das proteolytisch in die verschiedenen Proteinkomponenten gespalten wird. Verantwortlich hierfür sind sowohl virale Enzyme, die als Teil des Polyproteins autokatalytisch wirken und aktiviert werden, als auch zelluläre Proteasen/Signalpeptidasen.

Das Polyprotein wird aufgeteilt in Strukturproteine (Core, Envelop 1 und Envelop 2) und in Nicht-Strukturproteine (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B). Es enthält zusätzlich ein Membranprotein p7 zwischen den Strukturproteinen und Nicht-Strukturproteinen (Abbildung 1.2). Unter anderem weist HCV ein F-Protein (*frameshift*) oder ein ARFP (*alternative reading frame protein*) auf. Dieses wird durch die Verschiebung des offenen ribosomalen Leserahmens (ORF) +1 in der N-terminalen Domäne des Core-Proteins generiert. In chronisch infizierten Patienten konnte die Produktion des F-Proteins nachgewiesen werden (Walewski et al. 2001). Der exakte Translationsmechanismus, die genaue Funktion und welchen Einfluss das F-Protein auf die Pathogenese oder den Lebenszyklus von HCV hat, ist noch nicht bekannt (Xu et al. 2001; Branch et al. 2005).

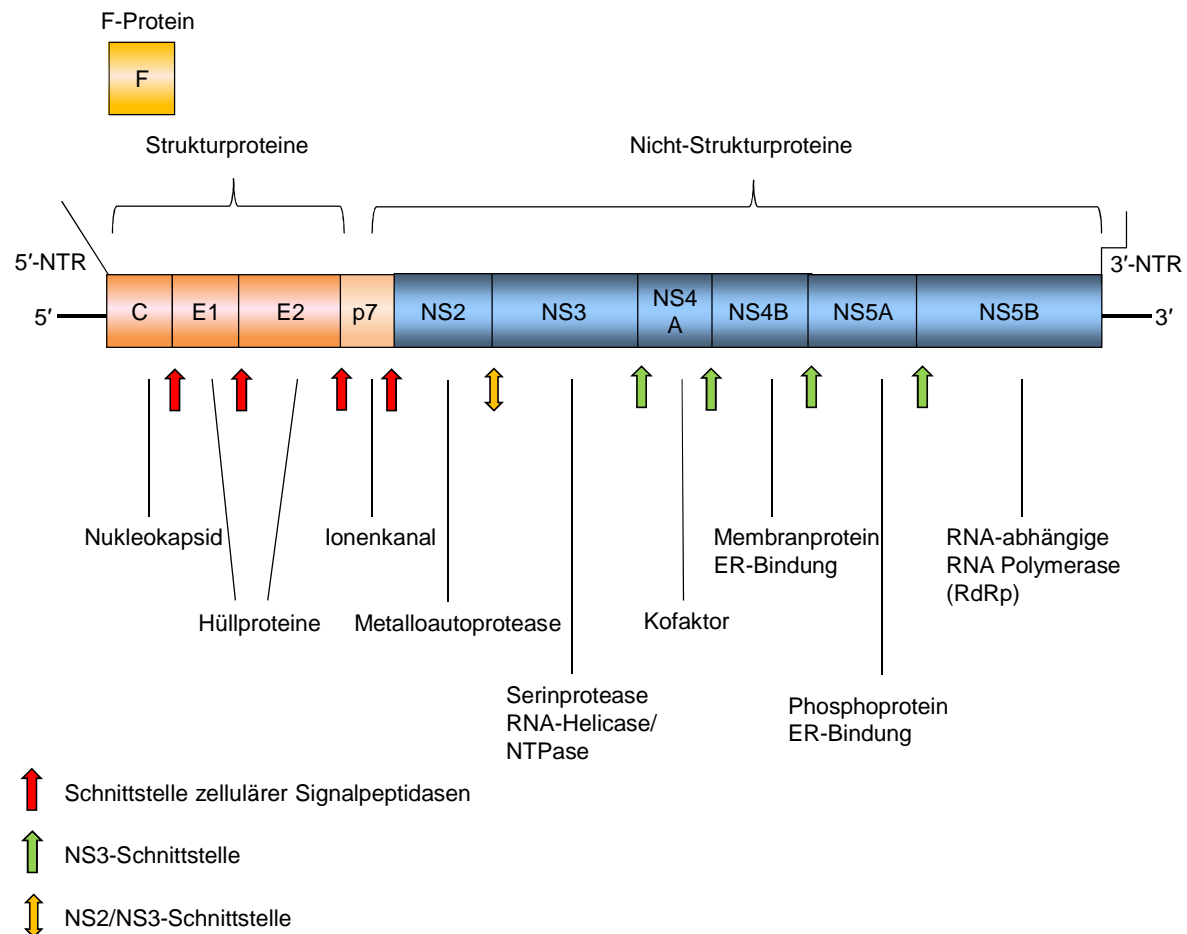


Abbildung 1.2: Aufbau des HCV-Genoms. Das HCV-Genom ist von 5'-NTR (nicht translatierten Nukleotidregionen) nach 3'-NTR aufgebaut. Das 5' -NTR beinhaltet die IRES (interne ribosomale Eintrittsstelle). Die spezifischen HCV-Proteine sind in Strukturproteine und Nicht-Strukturproteine aufgeteilt und deren Hauptfunktionen angegeben. Die Schnittstellen der verschiedenen zellulären und viralen Proteasen sind mit Pfeilen markiert.

Das Hepatitis C Virus ist als nichtzellulärer Parasit auf die Stoffwechselaktivität der Wirtszelle angewiesen. Zur Replikation des Erbguts ist es gezwungen, die Plasmamembran der Wirtszelle durch pH-Wert-abhängige Endozytose zu überwinden und zytosolische und/oder nukleäre Komponenten der Zelle für seine Zwecke zu verwenden (Bartosch et al. 2003b; Hsu et al. 2003). Am N-Terminus des HCV-Genoms befindet sich das Core-Protein, dessen Hauptaufgaben der Einschluss der viralen RNA und die Bildung des Nukleokapsids sind. Im Anschluss folgen die Glykoproteine E1 und E2, die in Form von Heterodimeren transmembran in die Doppellipidschicht des Kapsids integriert sind. Beim HCV ist die Rezeptorbindung ein sehr komplexer und vielschichtiger Prozess. Das initiale Andocken an die Zelle erfordert mehrere Rezeptoren und Ko-Rezeptoren wie Glykosaminoglykane, den *low density lipoproteine* (LDL)-Rezeptor, die zellspezifischen intrazellulären

Adhäsionsmoleküle (DC-SIGN und L-SIGN), CD81, den *scavenger receptor class B type 1* (SR-B1) und Claudin-1 (CLDN-1) (Sabahi 2009). Kürzlich wurde zusätzlich die Rolle des Transmembranproteins Occludin-1 (OCLDN-1) als ein weiterer HCV-spezifischer zellulärer Rezeptor beschrieben (Ploss et al. 2009). Es wird angenommen, dass Claudin-1 und Occludin-1 zwei Faktoren sind, die für das Eindringen von HCV essentiell sind (Pietschmann et al. 2009). Das E2-Protein bindet an CD81, ein Mitglied der Tetraspaninsuperfamilie, das unter anderem auf Hepatozyten exprimiert wird (Pileri et al. 1998). Die CD81-Proteine sind funktionell bedeutsam bei der Zelladhäsion, -aktivierung und -motilität sowie bei Signalübertragungswegen (Levy et al. 1998). Man vermutet, dass Claudin-1 nach der Virusbindung an die Zelle und der Interaktion mit CD81 beteiligt ist (Evans et al. 2007). Die Prozessierung der Strukturproteine in die einzelnen, funktionell aktiven Bestandteile erfolgt durch zelluläre, mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) assoziierte Signalpeptidasen (Abbildung 1.3) (Dubuisson et al. 2002). Für alle weiteren Prozessierungen sind im Wesentlichen virale Proteasen verantwortlich. Der carboxyterminale Bereich des E2-Proteins enthält unter anderen eine hochvariable Region I (HVRI). Durch die hohe Variabilität dieser Region wird die Chance der Identifizierung durch die humorale Immunantwort während der Infektion verringert (Farci et al. 2000). Es wird vermutet, dass die HVRI die Bindung des E2 an den zellulären Rezeptor CD81 reguliert (Roccasecca et al. 2003; Sklan et al. 2009; Zeisel & Baumert 2009).

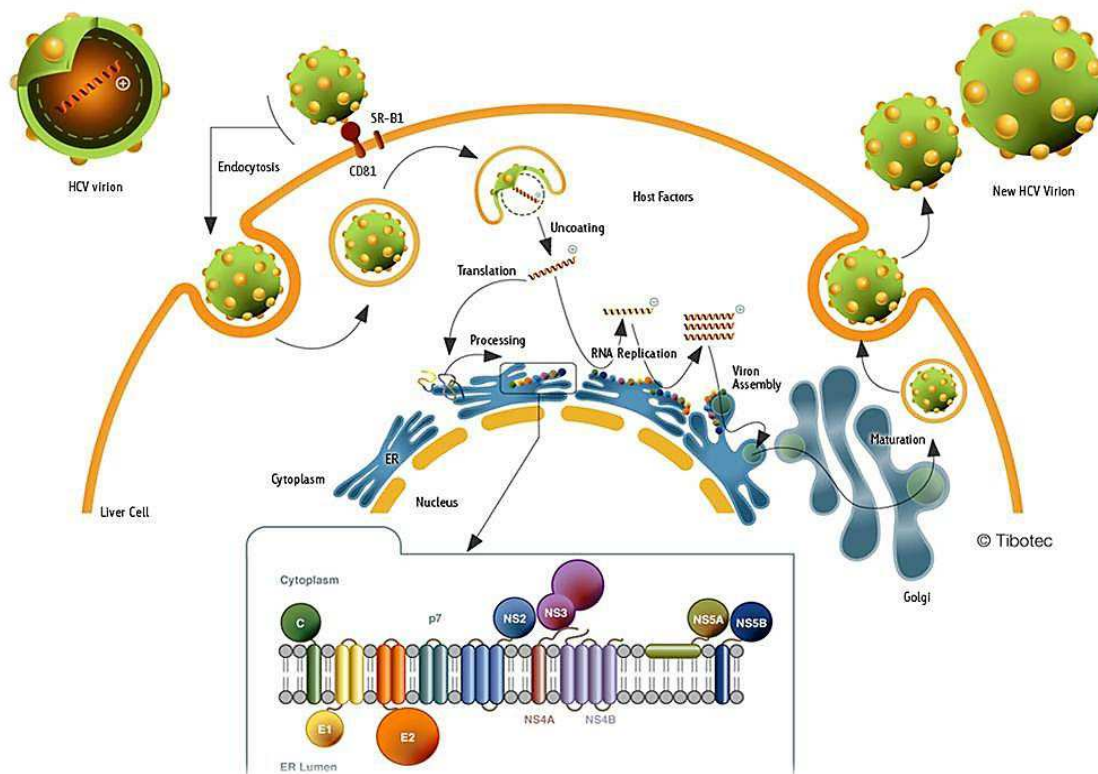


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HCV. Nach dem Eindringen des Virus in die Zelle wird die virale RNA freigegeben und translatiert. Die Prozessierung der Proteine erfolgt im Replikationsprozess durch die Bindung am rER. (hier nochmal vergrößert dargestellt). Die RNA wird repliziert und in neue Virionen verpackt. Das neue Viruspartikel verlässt die Wirtszelle mittels Exozytose (tibotec-hcv.com).

Das Membranprotein p7 wurde der Gruppe der Viroporine zugeordnet, die für die Bildung von Ionenkanälen und die Freisetzung von Virionen in den letzten Schritten der Virusreplikation wichtig sind (Carrère-Kremer et al. 2002; Steinmann et al. 2007).

Die Nicht-Strukturproteine NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B werden im 3'-terminalen Bereich des Genoms kodiert und übernehmen verschiedene Funktionen in der viralen RNA-Replikation und der proteolytischen Prozessierung des Polyproteins (Lohmann et al. 1999b; de Francesco und Steinkühler 2000). NS2 gehört zu den hydrophoben Transmembranproteinen und besitzt zwei interne Signalsequenzen, die sich mit der ER-Membran verknüpfen können (Santolini et al. 1995; Yamaga und Ou 2002). Es bildet in Fusion mit NS3 die katalytische Domäne einer Zn^{2+} -abhängigen Protease, die zwischen NS2 und NS3 spaltet (Grakoui et al. 1993; Hijikata et al. 1993). NS3 ist in allen Flaviviren ein bifunktionelles Protein. Es besteht zum einen aus einer N-terminalen Serinprotease und zum anderen aus einer C-terminalen RNA-Helikase/NTPase-Domäne. Mit der N-terminalen

Serinprotease-Domäne interagiert NS3 mit dem NS4A-Protein und bildet so ein Heterodimer, wodurch die Proteaseaktivität verstärkt wird (Yue et al. 2000). Die NS3/NS4A-Protease ist für die Spaltung der C-terminalen Proteine verantwortlich, die dem NS3-Protein folgen. Die Helikase/NTPase-Domäne ist ebenfalls essentiell für die Translation und die Replikation des HCV-Genoms (Bartenschlager et al. 1993). Das membranverankerte NS4B-Protein induziert die Ausbildung spezieller Membrankompartimente, an denen die Replikation des Virusgenoms stattfindet (Egger D. 2002). NS5A, ein Membran-assoziiertes Protein, ist RNA-bindend und spielt eine bedeutsame Rolle bei der Genomreplikation. Es beeinflusst zelluläre Signaltransduktionswege, die in der angeborenen Immunität von Bedeutung sind (Evans et al. 2004; Appel et al. 2006). Unter anderem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen NS5A mit NS5B entscheidend für die Aufrechterhaltung des subgenomischen Replikons ist (Shirota et al. 2002; Shimakami et al. 2004). Das NS5B-Protein ist die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) und zuständig für die Transkription der HCV-RNA. Durch die geringe Transkriptionsgenauigkeit und das Fehlen eines Korrekturmechanismus der RdRP entsteht eine Mutationsrate von 10^{-3} Nukleotiden pro Generation. Dadurch zirkuliert im Organismus eine hohe Anzahl an eng verwandten HCV-Varianten, die man auch Quasispezies nennt. NS5B ist ebenfalls ein Membran-assoziiertes Protein und kann die *de novo*-Synthese von RNA *in vitro* und *in vivo* einleiten, wobei die Aktivität durch die Interaktion mit anderen viralen Proteinen wie NS3 und NS5A moduliert werden kann (Bartenschlager et al. 2004). In einem Replikationszyklus produziert HCV beim Menschen etwa 10^{12} Virionen pro Tag (Neumann et al. 1998). Die dabei neu entstehenden Viruspartikel, verlassen die Zelle wahrscheinlich durch Exozytose (Bartenschlager et al. 2003). Um die Situation *in vitro* nachzustellen, ist ein Zellkultur-Modell nötig, das den HCV-Zelleintritt, die virale Replikation und die Sezernierung infektiöser Partikel ermöglicht.

1.1.3 Modellsysteme *in vitro*

Für die Untersuchung des Hepatitis C Virus war ein geeignetes *in vitro*-Modell unabdingbar. Dabei gibt es verschiedene Varianten von Replikons. Das subgenomische Replikon Con1 beinhaltet eine Konsensussequenz des HCV-GT 1b, die die Nicht-Strukturproteine des Virus für die RNA-Replikation enthält und anhand dessen die physiologischen und intrazellulären Bedingungen untersucht werden können (Lohmann et al. 1999a). Um eine Selektion möglich zu machen, wurden die

Strukturproteine mit dem Gen für die Neomycinphosphotransferase ersetzt. Zusätzlich wurde eine interne Ribosomeneintrittsstelle des Enzephalomyokarditisvirus und ein T7-RNA-Polymerasepromotor eingebaut, um die Replikation zu ermöglichen (Abbildung 1.4).

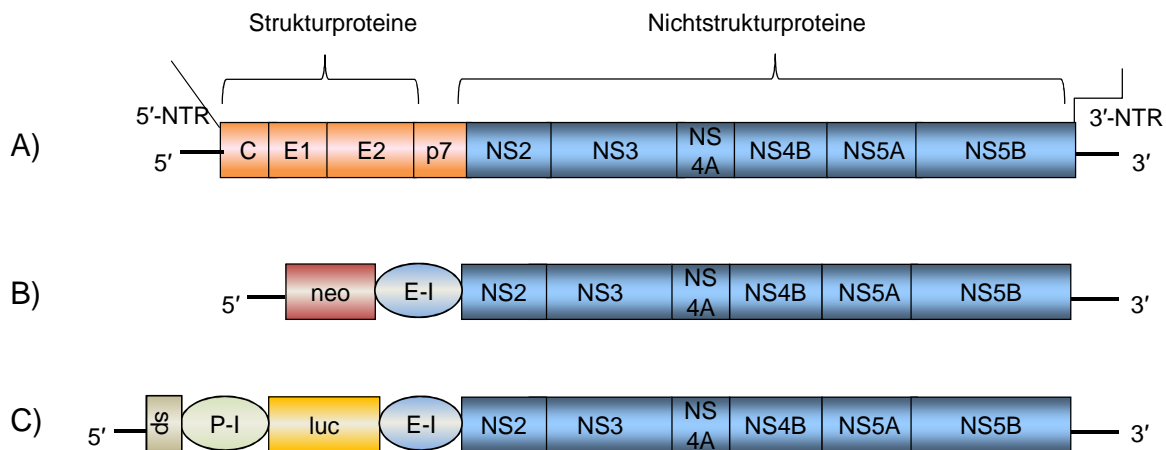


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der HCV-Vektoren. A) Schematische Darstellung des HCV-Genoms von 5'-NTR bis 3'-NTR mit Strukturproteinen und Nicht-Strukturproteinen. B) Struktur des Replikonkonstruktes pFK-I389neo/NS3-3'/ET bestehend aus der 5'-NTR und den Nicht-Strukturproteinen von HCV sowie der HCV-IRES, dem Neomycinphosphotransferasegen (neo) und der IRES des Enzephalomyokarditisvirus (E-I). C) Das Replikonkonstrukt pFK-I341PI-luc/NS3-3'/Con1/ET besitzt anstelle des neo das Luziferasegen (luc) sowie zusätzlich eine 63 bp-lange Spacer-Region (sp) und eine Polivirus-IRES (P-I).

Nach der Transfektion in die humane Hepatomazelllinie Huh7 wurden die Zellen mit Hilfe des Antibiotikums G418 selektiert. Das Zellwachstum und die Koloniebildung erfolgt nur durch die Amplifizierung der viralen RNA und dem zusätzlichen Neomycingen (Abbildung 1.5). Einige bi-cistronen Replikons enthalten anstelle des Neomycinphosphotransferase-Gens das Luziferase-Gen. Dies wird für transiente Replikonversuche verwendet, durch die z.B. adaptive Mutationen identifiziert werden. Durch welchen Mechanismus adaptive Mutationen in einem Replikonsystem eingefügt werden, ist noch unbekannt. Die häufigsten adaptiven Mutationen treten in den Proteinen NS3, NS5A und NS5B auf und führen zu einer erhöhten RNA-Replikation (Blight et al. 2000; Bartenschlager 2002; Lohmann et al. 2003).

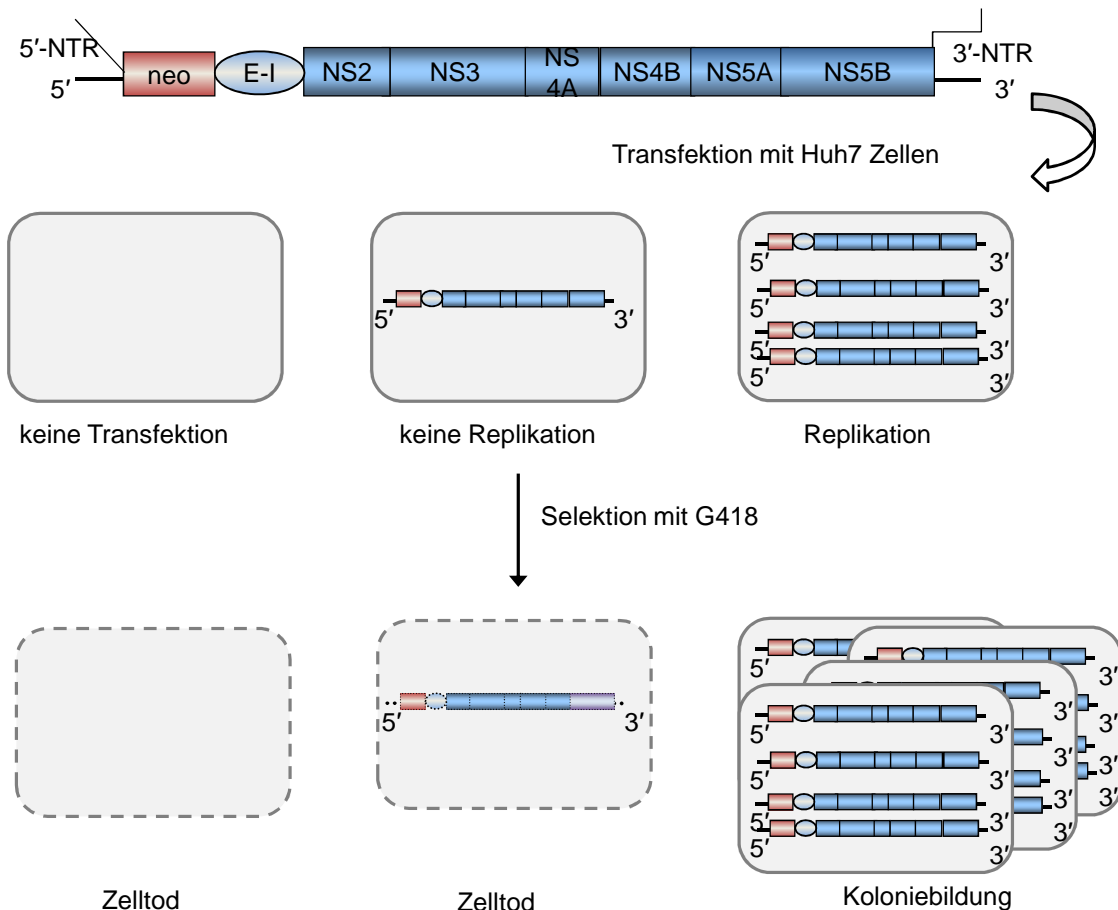


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Transfektion von Huh7-Zellen mit dem pFK-I389neo/NS3-3'/ET-Vektor. Das Plasmid pFK-I389neo/NS3-3'/ET wird linearisiert und als Matrize zur *in vitro*-Transkription von Replikon-RNA verwendet. Die Huh7-Zellen werden durch Elektroporation mit den RNA-Transkripten transfiziert. Durch die Zugabe von G418 erfolgt die Selektion von Zellen, in denen die Replikons effizient replizieren und daraufhin Kolonien bilden.

Darüber hinaus wurde ein infektiöses HCV-Zellkultursystem entwickelt. Das Replikon beinhaltet ein komplettes HCV-Genom. Dieses wurde aus einem Patienten mit einer fulminanten Hepatitis isoliert, der mit dem GT 2a infiziert wurde. Das JFH-1 (*Japanese fulminant hepatitis-1*)-Konstrukt ist in der Lage, Viruspartikel (HCV-cc) zu produzieren und naive Huh7-Zellen zu infizieren (Wakita et al. 2005). Bei schimären Konstrukten wird die strukturelle Region des JFH-1 durch den J6-GT-2a-Klon ersetzt und führt zu einer effizienteren Infektionsrate (Lindenbach et al. 2005). Die Viruspartikel des JFH-1-Replikonsystems sind hervorragend geeignet, um die verschiedenen Aspekte des HCV-Lebenszyklus zu studieren, z.B. die Bindung und das anschließende Eindringen in die Wirtszelle sowie die Replikation

des Virus in der Zelle. Der GT 2 ist jedoch weltweit nicht dominant, was zu einem limitierenden Faktor bei Untersuchungen mit dem JFH-1-Viruspartikel führt.

Eine Alternative ist die Entwicklung von HCV-Pseudopartikeln (HCVpps). Für die Untersuchung verschiedener Mechanismen im Virus und die Analyse des frühen Lebenszyklus des Virus sind sie essentiell. Die virusähnlichen Partikel entstehen aus drei verschiedenen Vektoren, deren Eigenschaften optimal fusioniert werden. Verantwortlich für die Ausbildung von Partikeln an der Plasmamembran und die Verpackung der RNA sind retrovirale Proteine. Für den viralen Tropismus und die Fusionierung der HCVpps mit den Zielzellen wird ein Vektor verwendet, der die Glykoproteine E1 und E2 kodiert. Durch einen weiteren Vektor wird das Reportergen Luziferase oder das grün-fluoreszierende Protein (GFP) hinzugefügt. Anhand dessen kann die Infektionsrate der HCVpps quantitativ ermittelt werden. Die HCVpps können mit monoklonalen Antikörpern gegen E1 und E2 sowie mit dem Serum von infizierten HCV-Patienten neutralisiert werden (Hsu et al. 2003; Cai et al. 2005). Außerdem sind die HCVpps hervorragend geeignet für die Identifizierung von Inhibitoren, die das Eindringen in die Wirtszelle verhindern sollen. Die Entwicklung von subgenomischen Replikons, die Herstellung von HCVpps und die Möglichkeit, Virionen im Zellkultursystem zu produzieren, wird den Prozess der Medikamentenentwicklung gegen HCV in den kommenden Jahren zunehmend optimieren.

1.2 Die HCV-Genotypen und die Virusdynamik

Aufgrund der hohen genetischen Variabilität kann das Virus aktuell in 7 Genotypen und in eine Vielzahl von Subtypen unterteilt werden (Murphy et al. 2007). Die globale Verteilung der HCV-Genotypen ist regional abhängig. In den meisten Regionen der Welt sind die Genotypen 1a/b und 3 am häufigsten. (Simmonds et al. 2005). Durch die fehlende *proof-reading*-Funktion der RNA-abhängigen RNA-Polymerase kommt es zu hohen Mutationsraten bei der HCV-Replikation. Durchschnittlich erfolgen dabei 10^{-4} - 10^{-5} Nukleotidaustausche pro Generation (Holland et al. 1982; Drake et al. 1998). Einmal aufgetretene Fehler können nicht wieder korrigiert werden. Die Folge der häufigen Punktmutationen ist eine große natürliche Variabilität bei der Vermehrung. Es werden heterogene Generationen von eng verwandten Virusvarianten in ein und demselben Wirt erzeugt, die sogenannte Quasispezies. In öffentlichen Datenbanken wird üblicherweise die Konsensus-Sequenz der Quasispezies präsentiert. Die Entwicklung der Quasispezies lässt eine bedeutende

Konsequenz während der Übertragung von HCV vermuten. In RNA-Viren wird die Häufigkeit der Genotypen maßgeblich durch das Einwirken von Mutationen beeinflusst (Wilke 2005). So können die Kompositionen verschiedener Sequenzvarianten für einen häufig vorkommenden GT verantwortlich sein (Domingo et al. 2006). Die Genotypen sind somit ein Produkt aus Quasispezies, die durch die Balance aus Mutation und Selektion innerhalb einer Population vorkommen. Je nach Art der HCV-Übertragung schwankt die Zahl der viralen RNA-Kopien, wodurch die eigentliche Komplexität der Sequenz-Diversität, die im Wirt vorkommt, nicht vollständig repräsentiert wird. Das daraus resultierende „*Bottleneck*“-Phänomen kann zu einer Limitierung der viralen Diversität und zu einer enormen Reduzierung der viralen Fitness führen (Elena & Sanjuán 2007). Charakteristisch für den genetischen „*Bottleneck*-Effekt“ ist die Reduzierung oder Eliminierung von Varianten in der Viruspopulation, hervorgerufen durch den starken Immundruck des Wirtes. Die daraus resultierenden wenigen, aber stark mutierenden Varianten dominieren in der weiteren Entwicklung der Viruspopulation. Dieses Phänomen wurde schon in mehreren Virus-Arten wie Influenza, HIV und HCV beschrieben (Sheridan et al. 2004; Shankarappa et al. 1999)(Koelle et al. 2006). Das „*Bottleneck*“-Phänomen kann als stetige und schrittweise Veränderung ausgelegt werden, wodurch sich schließlich die erfolgreiche Virusvariante im Wirt, insbesondere durch äußeren Selektionsdruck in der frühen Phase der Infektion, durchsetzen kann.

1.3 Pathogenese der HCV-Infektion

1.3.1 Klinik, Verlauf und Therapie

Die Übertragung des Hepatitis C Virus erfolgt hauptsächlich auf parentalem Weg, also durch direktes Eindringen des Erregers in die Blutbahn des Empfängers. Vor der Einführung geeigneter HCV-Nachweisverfahren wurde ein Großteil der heutigen HCV-Patienten durch verunreinigte Bluttransfusionen oder Blutprodukte infiziert. Vor seiner Identifizierung 1989 wurde HCV als parental übertragenes Non-A, Non-B Hepatitis Virus bezeichnet. Heute dürfte einer der wichtigsten Übertragungswege das Teilen von Spritzenbesteck unter intravenös-Drogenabhängigen (IVDA) sein. Die perinatale Übertragung einer Hepatitis C von der (chronisch infizierten) Mutter auf das Neugeborene liegt bei 5 %. Dabei scheint das Stillen kein zusätzliches Risiko darzustellen. Auch die sexuelle Übertragung ist wesentlich seltener als z.B. bei der Hepatitis B.

Die akute HCV-Infektion wird in den meisten Fällen nicht diagnostiziert, da sich die Symptome der Erkrankung unspezifisch und eher mild äußern. Die durchschnittliche Inkubationszeit beläuft sich auf sechs bis acht Wochen. Dabei ist die hohe Viruslast in der frühen Phase charakteristisch für die akute HCV-Infektion (Thimme et al. 2001). Lässt sich die Virus-RNA nach sechs Monaten immer noch nachweisen, spricht man von einer chronischen Infektion. Während es bei einem geringen Prozentsatz der HCV-infizierten Patienten zu einer spontanen Ausheilung kommt, entwickeln hingegen 50-80 % der infizierten Patienten einen chronischen Krankheitsverlauf, der über einen langen Zeitraum asymptomatisch bleiben kann. Bei 20 % der unbehandelt chronisch infizierten Patienten entsteht eine Leberzirrhose. Diese wiederum tragen ein hohes Risiko in der Folge ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) zu entwickeln (Perz et al. 2006). Die Diagnose einer HCV-Infektion erfolgt durch den Nachweis spezifischer Antikörper bzw. viraler Nukleinsäure. Den wichtigsten Ansatz stellt der ELISA-Test (*enzyme-linked immunosorbent assay*) dar, der als Suchtest die spezifischen Antikörper gegen HCV nachweisen kann. Zur Bestätigung der Spezifität der Antikörper dieses Suchtests kann ergänzend ein Immunoblot oder analoge Verfahren als Bestätigungstests eingesetzt werden. Die Detektionsgrenze bei neuen quantitativen Tests liegt bei 12 IU/ml. Als Material wird Serum oder Plasma verwendet. Zusätzlich wird über die Polymerasekettenreaktion und einem anschließenden Hybridisierungstest oder durch Sequenzierung der GT bestimmt.

Ein prophylaktischer Impfstoff gegen das Hepatitis C Virus wurde bis heute noch nicht entwickelt. Sowohl die akute als auch die chronische Hepatitis C können therapiert werden. Die Therapie der akuten HCV-Infektion mit pegyliertem Interferon- α (PEG-IFN- α) über einen Zeitraum von 24 Wochen führt in über 90 % der Fälle zu einer Normalisierung der Leberwerte und zur anhaltenden Viruseradikation. Die Kombinationstherapie von PEG-IFN- α und Ribavirin hat sich bei der Behandlung der chronischen Infektionen bewährt. Der Therapieerfolg und die Therapiedauer sind jedoch abhängig vom GT der Infektion. So wird in etwa 80 % der Patienten eine komplette Eradikation des Virus und eine anhaltende Heilung durch die Kombinationstherapie bei Infektionen mit GT 2 oder GT 3 erreicht, während dieses Therapieziel bei dem GT 1 und GT 4 nur in 50 % erreicht wird (Chevaliez et al. 2009). Neue Medikamente, wie z.B. Hemmstoffe der viralen Protease NS3 (Boceprevir und Telaprevir), wurden im August 2011 neu zugelassen

und werden die Heilungsrate für den GT 1 sicher verbessern (Zeuzem et al. 2011; Berman & Kwo 2009; Foster et al. 2011).

1.4 Die Ostdeutsche Anti-D Kohorte

Da es kein geeignetes Modell für die HCV-Infektion gibt, stellen HCV-Ausbrüche mit einem identischen Virusisolat besonders wertvolle Kohorten für die Untersuchung von Virus/Wirt-Interaktionen dar. In den Jahren 1977/78 kam es aufgrund HCV-kontaminierter Anti-D Immunglobuline, die während der Rhesusprophylaxe verabreicht wurden, zu einem großen HCV-Ausbruch mit einer GT 1b-Variante, bei dem über 2867 schwangere Frauen infiziert wurden (Bericht der Staatlichen Hygiene-Inspektion vom 26. November 1979, Ministerium für Gesundheitswesen der DDR.). Bei der Entstehung des ostdeutschen HCV-Ausbruchs lässt sich folgendes Szenario vermuten: Für die Herstellung der Anti-D Immunglobuline wurden von einer HCV-infizierten Rhesus-positiven (RhD+) Spenderin rote Blutkörperchen gesammelt, und mit diesen fünf Rhesus-negative (RhD-) Individuen immunisiert. Nach drei bis fünf Wochen wurde das Plasma der fünf Individuen für die Präparation der Anti-D Immunglobuline verwendet. Dabei wurden insgesamt acht verschiedene Immunglobulin-Chargen erstellt (Wiese et al. 2000). Innerhalb dieses Zeitraums wurde bei zwei Plasmaspendern eine akute Hepatitis diagnostiziert. Nach Applikation der kontaminierten Anti-D Immunglobuline wurde bei 93 % der Frauen eine akute Hepatitis diagnostiziert. 25 Jahre nach dem Ausbruch konnte bei 54 % der betroffenen Frauen, durch spontane Ausheilung oder Therapieerfolg, das Virus eliminiert werden. Von 46 % der Fälle mit einer chronischen Hepatitis C entwickelten 0,5 % eine Leberzirrhose und 0,05 % ein hepatozelluläres Karzinom (Wiese et al. 2005).

1.5 Die Immunantwort bei einer HCV-Infektion

1.5.1 Die angeborene Immunantwort

In der frühen Phase der HCV-Infektion wird die angeborene Immunantwort aktiviert, indem infizierte Zellen selbst oder patrouillierende Immunzellen virale Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) über *Pattern-Recognition-Rezeptoren* (PRR) erkennen. HCV-infizierte Zellen, wie beispielsweise Hepatozyten, erkennen die spezifischen doppelsträngigen RNA (dsRNA)-Strukturen mit Hilfe der Rezeptoren TLR3 (*Toll-like receptor 3*) und dem

MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*). RIG-I (*retinoic acid-induced gene 1*) ist ein zytosolischer PRR, der sowohl einzel- als auch doppelsträngige RNA binden kann (Liu & Gale 2010). Diese Rezeptoren aktivieren über ihre Adaptormoleküle, dem IPS-1 (*IFN- β -promoter stimulator protein-1*, auch *CARD adaptor inducing interferon β* , (CARDIF) genannt) und TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), verschiedene Signaltransduktionswege und induzieren die Bildung von Typ 1 Interferonen. Durch die Bindung von IFN- β an den IFN α/β -Rezeptor der infizierten Zellen, wird der JAK/STAT-Signalweg aktiviert und IFN-stimulierende Gene (ISGs) induziert. Diese verstärken zusätzlich die IFN-Antwort (Rehermann 2009). Des Weiteren induzieren ISGs Effektorproteine, welche einerseits virale und zelluläre mRNA degradieren und andererseits die Translation der RNA inhibieren (Bode et al. 2008).

Trotz dieser frühen Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems kann HCV die IFN-Antwort auf mehreren Ebenen vermindern. So spaltet die NS3/NS4A-Protease die zellulären Adaptormoleküle TRIF und IPS-1 und hemmt dadurch die Interferon-regulatorischen Faktoren RIG-I und TLR3 (Liu & Gale 2010). Die Aktivierung und Synthese von IFN- α und IFN- β kann nicht eingeleitet werden. Unter anderem unterbindet das HCV-Core-Protein durch die Aktivierung von Inhibitoren (SOCS3) und Proteinphosphatasen (PP2A) den JAK/STAT-Signalweg, was letztlich die transkriptionale Aktivität verschiedener ISG-Faktoren reduziert (Bode et al. 2003; Lin et al. 2006). Die HCV-Proteine E2 und NS5A beeinflussen und hemmen die Funktion der Proteinkinase R (PKR), die zu den Effektorproteinen gehört.

Neben der Aktivierung von Typ 1 Interferonen spielen bei der angeborenen Immunantwort verschiedene Immunzellen eine große Rolle. So sind intrahepatische Lymphozyten, wie natürliche Killerzellen (NK), natürliche Killer-T-Zellen (NKT) und leberspezifische Makrophagen wie Kupffer-Zellen (KC) bei der Infektion der Leber involviert. NK-Zellen sezernieren Perforin und Granzym, was zur Lyse infizierter Zellen führt. Sie produzieren antivirale Zytokine, wie IFN-gamma (IFN- γ), und werden durch Interleukin-12 (IL-12) und Interleukin-18 (IL-18), welches von Kupffer-Zellen sezerniert wird, in ihrer Aktivität noch gesteigert (Lauwerys et al. 2000). Außerdem stimulieren aktivierte NK-Zellen mit Hilfe der Zytokine, Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und IFN- γ die Reifung dendritischer Zellen (Münz et al. 2005).

Anders als normale T-Zellen verfügen NKT-Zellen über einen invarianten T-Zell-Rezeptor (TCR), der Lipide und Glykolipide auf dem MHC-ähnlichen Molekül CD1 erkennt. Somit sind sie in der Lage, ihre Effektorfunktion direkt nach Antigenkontakt auszuüben (Bendelac et al. 1995). CD1 wird auch auf Hepatozyten und Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiert. Neben Fas-vermittelter Lyse der Zielzelle sezernieren aktivierte NKT-Zellen große Mengen an IFN- γ und Interleukin-4 (IL-4), wobei ihre Aktivität durch die Produktion von IL-12 der Kupffer-Zellen noch zusätzlich stimuliert wird (Bendelac et al. 1997). Obwohl NK-Zellen und NKT-Zellen in der direkten Abwehr von Infektionen eine Rolle spielen, können sie zusätzlich durch die Sekretion von Zytokinen einen Einfluss auf die adaptive Immunantwort nehmen (Benseler und Schlitt 2011).

1.6 Die adaptive Immunantwort

1.6.1 Die humorale Immunantwort

Die Rolle der humoralen Immunantwort bei der HCV-Infektion ist bis heute nicht vollständig geklärt. Die humorale Immunantwort wird ausgelöst, wenn B-Zellen an HCV-spezifische Antigene binden und von T-Helferzellen (Th) weiter stimulatorische Signale erhalten und ist erst 8-20 Wochen nach der Infektion nachweisbar (Thimme et al. 2002). Die Ursache für diese Verzögerung der Immunantwort ist unklar. Während der späten akuten aber auch in der chronischen HCV-Infektion kommt es zu einer massiven Bildung von Antikörpern. Diese sind jedoch offenbar nicht in der Lage, das Virus zu neutralisieren und die Infektion einzudämmen. Gleichzeitig bieten diese Antikörper keinen Schutz vor einer Neuinfektion. Ein wichtiger Mechanismus, mit dem HCV der humoralen Immunantwort entkommt, ist die Selektion von „Escape“-Mutationen. Wie schon in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, ist die hohe Variabilität im C-terminalen Bereich des E2-Proteins charakteristisch und entsteht durch den kontinuierlichen Selektionsdruck der humoralen Immunantwort (Hahn & Liewehr 2007). Daraus ergibt sich, dass zwar kontinuierlich neue neutralisierende Antikörper gebildet werden, diese aber regelmäßig nicht in der Lage sind, die aktuell vorherrschende Sequenz zu neutralisieren. Allerdings konnten jüngere Untersuchungen zeigen, dass die Kinetik von neutralisierenden Antikörpern in der frühen Phase der Infektion durchaus eine Rolle spielt. Patienten mit spontaner Ausheilung der HCV-Infektion bilden früher hohe Titer neutralisierender Antikörper als Patienten mit einem chronischen Verlauf (Pestka et al. 2007).

1.6.2 Die zelluläre Immunantwort

Die wesentliche Bedeutung der zellulären Immunantwort für die Ausheilung der HCV-Infektion konnte initial im Schimpansenmodell gezeigt werden. In zeitlicher Korrelation mit dem vermehrten Vorkommen HCV-spezifischer T-Zellen, und der dadurch induzierten Expression von IFN- γ , sinkt die Viruslast in der Leber erheblich. Während der akuten Phase der HCV-Infektion sind CD4⁺ T-Zellen essentiell. Eine starke HCV-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort steht in Zusammenhang mit der Kontrolle und der Ausheilung der HCV-Infektion. Für die zelluläre Immunabwehr produzieren HCV-spezifische CD4⁺ T-Zellen kontinuierlich IL-2 und IFN- γ . Dadurch werden unter anderem Makrophagen aktiviert. Auch CD8⁺ T-Zellen produzieren sowohl im Blut als auch in der Leber nach Antigenkontakt IFN- γ und TNF- α und entwickeln eine zytolytische Aktivität. Die zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) lysieren die infizierten Zellen, indem sie mit Hilfe von Granzym und Perforin die Fas-vermittelte Apoptose einleiten. Die Balance dieser beiden T-Zellarten (CD4⁺ und CD8⁺) scheint für die Ausheilung während der akuten HCV-Infektion relevant zu sein. Anhand einer Studie mit Schimpansen konnte nachgewiesen werden, dass durch die Depletion von CD4⁺ T-Zellen und der Verlust der CD4⁺ T-Zellantwort, die CD8⁺ T-Zell-vermittelte Immunität vermindert wird und sich eine persistierende Infektion entwickelt (Grakoui et al. 2003). In einer ähnlichen Studie wurden CD8⁺ T-Zellen in Schimpansen depletiert. Nach Infektion mit HCV zeigte sich bei diesen Tieren eine hohe Virämie, die erst dann wieder kontrolliert wird, nachdem HCV-spezifische CD8⁺ T-Zellen in der Leber detektiert werden konnten. Eine chronische HCV-Infektion ist dagegen assoziiert mit einer schwachen T-Zellantwort (Lauer et al. 2004). Dabei zeigen die T-Zellen vermehrt funktionelle Defizite, wie beispielsweise verminderte Zytotoxizität, Zytokinsekretion und Proliferation. Viele dieser Daten basieren auf vergleichenden Beobachtungen von Patienten mit einer ausgeheilten und Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion. Nur wenige Studien haben die Immunantwort longitudinal in Patienten mit einer frischen Infektion verfolgt. Aus diesen Längsschnittuntersuchungen deutet sich an, dass in der frühen Phase die zelluläre Immunantwort intakt ist und sich nicht wesentlich unterscheidet zwischen Patienten mit Ausheilung und Patienten mit chronischem Verlauf (Cox et al. 2005a). Offenbar kommt es also zu einem sekundären Versagen der T-Zellantwort. Sowohl Wirtsfaktoren als auch virale Faktoren spielen bei dem Versagen der Immunantwort mit der Folge der Chronifizierung der HCV-Infektion eine Rolle.

1.6.2.1 Prozessierung und Präsentation von Antigenen

Das Immunsystem hat Mechanismen entwickelt, um mit Hilfe von T-Zellen Pathogene zu erkennen und zu eliminieren. Bei der Antigenprozessierung werden Antigenfragmente fraktioniert und anschließend auf der Zelloberfläche mit Hilfe des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) präsentiert. Im Falle des MHC-Klasse-I Komplexes findet der Prozess im Zytosol der antigenpräsentierenden Zellen (APC) statt und beginnt mit der Degradierung des pathogenen Proteins in kleinere ubiquitinierte Peptidfragmente. Eine wichtige Rolle beim zytosolischen Proteinabbau spielt ein multikatalytischer Proteasekomplex, das sogenannte Proteasom. Die vom Proteasom hergestellten Peptide transportiert das heterodimere ATP-bindende Peptidtransporter-Protein TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*) ins endoplasmatische Retikulum (ER). Dort können sie an partiell gefaltete MHC-I-Moleküle binden, die mit TAP verbunden bleiben (Kloetzel 2001). Die Peptidbindung stellt einen wesentlichen Schritt beim Zusammenbau des MHC-I-Moleküls dar und erfolgt, bevor die Proteinfaltung vervollständigt ist. Sobald das Peptid an das MHC-Molekül bindet, verlässt der entstandene Peptid-MHC-Molekül-Komplex das ER und wird über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert (Janeway 2001).

Die Peptide werden bevorzugt in einer Länge von 8-10 Aminosäuren von den vorhandenen MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert. MHC-Klasse-I-Moleküle setzen sich aus einer membranständigen schweren und einer löslichen leichten Kette (β_2m) zusammen. Die Größe der Peptidbindungsfurche, die von den schweren α -Ketten gebildet wird, limitiert die Länge der gebundenen Peptide. Die α -Kette wird durch sogenannte "Chaperon"-Moleküle wie Calnexin, Calreticulin und Erp57 gebunden, die die Peptidbindung regulieren. Tapasin bildet eine Brücke von der α -Kette zu TAP. Innerhalb der Bindungsfurche der MHC-Moleküle befinden sich hydrophobe Taschen, die von dem variablen Anteil des Proteins gebildet werden. Die Bindungsfurche kann über die C- und N-terminalen Taschen mit den passenden Aminosäuren eines Peptids interagieren. Besonders wichtig sind die C-terminalen Aminosäuren, die einen hydrophoben oder basischen Charakter besitzen und in den meisten Fällen auf Position 2 und 9 vorkommen. Durch diese Anker-Aminosäuren bindet nur eine kleinere Anzahl von Peptiden mit einer hohen Affinität an bestimmte MHC-Allele, die im Menschen auch *Human leucocyte antigen* (HLA)-Allele genannt werden. Da jedoch jedes Individuum bis zu 6 verschiedene HLA-Allele aufweist

(mütterliche und väterliche HLA-A, -B und -C), kann ein breites Spektrum von Peptiden präsentiert werden. Dabei unterscheiden sich die Peptide in Größe und Charakter zwischen den unterschiedlichen HLA-Allelen. Die HLA-Klasse-I-bindenden-Peptide beinhalten Allel-spezifische Sequenzmotive, sogenannte T-Zell-spezifische Epitope (Rothbard & Taylor 1988). Dadurch besitzen die meisten CD8 Epitope eine sehr spezifische HLA-Restriktion.

Peptide, die nicht die richtige Länge besitzen, können im ER durch Aminopeptidasen am N-Terminus verkürzt werden. Dies erfolgt durch die Interferon- γ -induzierbare Aminopeptidase (ERAAP) (Rock et al. 2010). Somit können nur Peptide mit der exakten Größe einen stabilen Komplex mit dem MHC-Klasse-I-Molekül bilden. Abschließend interagiert der T-Zell-Rezeptor mit diesem MHC-Molekül/Peptid-Komplex, indem er sowohl mit dem MHC-Molekül als auch mit dem antigenen Peptid in Kontakt tritt (Abbildung 1.6).

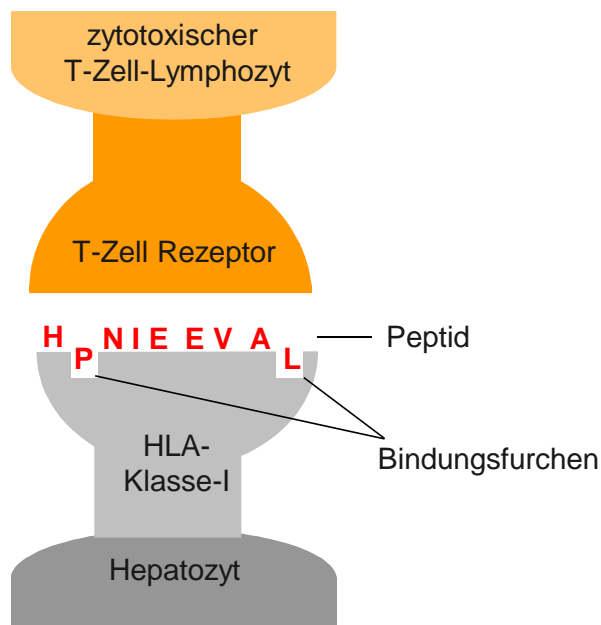


Abbildung 1.6: Darstellung der Antigenpräsentation im HLA-Klasse I-Peptid-Komplex eines Hepatozyten. Das Peptid wird dem T-Zell-Rezeptor eines zytotoxischen T-Zell-Lymphozyten präsentiert.

Der Mechanismus der Antigenpräsentation reagiert sehr sensitiv auf Variationen im Antigenpeptid. Mutationen im immungenetischen Peptid oder in der flankierenden Region des Epitops können die Antigenprozessierung oder die Präsentation unterbinden (Timm et al. 2007). Durch „Escape“-Mutationen in der Ankerregion der Bindungsfurche können die spezifischen Epitope auf dem HLA-Klasse-I-Molekül

nicht mehr gebunden werden. Ist die Verteilung der Mutationen jedoch auf der gesamten Epitopregion, so wird das Erkennen durch den T-Zell-Rezeptor verhindert. Mehrere Studien im Bereich der HIV-Infektionen konnten belegen, dass immundominante HLA-Allele, wie z.B. HLA-B*27, HLA-B*57 und HLA-B*13, mit der Kontrolle der Virusreplikation assoziiert sind. Hingegen ist das HLA-B*35-Allel assoziiert mit einem schnellen Krankheitsverlauf und einer hohen Virusrate (Carrington & O'Brien 2003; Pereyra et al. 2010). Auch in Studien im Bereich der HCV-Infektion konnte der Effekt der protektiven HLA-Allele nachgewiesen werden. Die Allele HLA-B*27 und HLA-B*57 konnten mit der spontanen Ausheilung der HCV-Infektion in Zusammenhang gebracht werden (McKiernan et al. 2004; Neumann-Haefelin & Thimme 2007; Kim et al. 2011). Der genaue Mechanismus, wie einzelne HLA-Allele die Kontrolle über das Virus dirigieren können, ist jedoch noch unklar.

1.6.3 Versagen der CD8⁺ T-Zellantwort durch verschiedene Mechanismen

Die primäre Entstehung von dysfunktionalen CD8⁺ T-Zellen ist assoziiert mit der steigenden Expressierung inhibitorischer Rezeptoren wie *Programmed Death 1* (PD-1), CD160, das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) oder T-Zell-Immunglobulin Mucin 3 (TIM-3) (Bensch et al. 2010; Kasprowitz et al. 2010). Die Rolle der unterschiedlichen inhibitorischen Rezeptoren auf virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen ist in verschiedenen chronischen Viruserkrankungen wie HIV, HCV oder HBV umfangreich untersucht (Lee et al. 2010). Eine ausführliche Studie veranschaulicht, dass das komplizierte Expressionsmuster der verschiedenen inhibitorischen Moleküle mit dem Schweregrad der Infektion assoziiert ist (Blackburn et al. 2009). So führt die Interaktion von PD-1 auf den T-Zellen mit dem Liganden PDL-1, der zum Beispiel auf Kupffer-Zellen, Sternzellen oder Hepatozyten in der Leber exprimiert wird, zur Inhibierung der Effektorfunktionen von CD8⁺ T-Zellen und zur Einleitung der Apoptose (Radziewicz et al. 2008; Nakamoto et al. 2008). HCV-spezifische CD8⁺ T-Zellen mit einem hohen Expressionslevel von PD-1 (PD-1⁺ CD8⁺ T-Zellen) weisen einen charakteristischen Phänotyp auf. Dabei ist das Expressionslevel des Gedächtnis-Vorläufer-Markers CD127 herunterreguliert (CD127_{low}) und der des T-Zell-Seneszenz-Markers CD57 hochreguliert (CD57^{high}). CTLA-4 beeinflusst aktivierte T-Zellen durch verschiedene inhibitorische

Mechanismen. Auf HCV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Leber von chronisch kranken Patienten konnte nicht nur eine Überexpression von PD-1 sondern auch von CTLA-4 nachgewiesen werden. Allerdings wurde die Ko-Expression von PD-1 und CTLA-4 nur in den, die Leber infiltrierenden, Lymphozyten nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass nur die Blockade beider Rezeptoren, die CD8⁺ T-Zellfunktionen wiederherstellt (Nakamoto et al. 2009). Des Weiteren wurden in dysfunktionalen CD8⁺ T-Zellen, die vermehrt im intrahepatischen Kompartiment auftreten, eine Überexprimierung von Tim-3 und PD-1 nachgewiesen. Interessanterweise ist dieser spezifische Phänotyp Tim-3⁺ PD-1⁺ häufiger auf HCV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen vertreten als auf HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, was die unterschiedlich verminderte Ausprägung von virusspezifischen T-Zellen erklären kann (Lee et al. 2010). Die Ko-Expressionen der zahlreichen inhibitorischen Rezeptoren auf HCV-spezifischen CD8 T-Zellen sind wiederum assoziiert mit dem niedrigen Expressionslevel von CD127 (Bensch et al. 2010).

Es wird vermutet, dass eine kontinuierlich große Antigenmenge zu dem dysfunktionellen Phänotyp von T-Zellen führt. Dazu können weitere Mechanismen beitragen, z.B. die regulatorischen CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen (Tregs). Sie beeinflussen die Dysfunktionen von HCV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. So wurde von mehreren wissenschaftlichen Arbeitsgruppen nachgewiesen, dass Tregs aktiv in chronisch infizierten Patienten vorkommen. Interessanterweise wurde nach Depletion der Tregs die Immunantwort der verantwortlichen HCV-spezifischen T-Zellen wieder hochreguliert (Sugimoto et al. 2003; Cabrera et al. 2004; Boettler et al. 2005). In diesem Fall unterdrücken die Treg-Zellen die Proliferation und die IFN- γ Produktion der HCV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen *in vitro* (Accapezzato et al. 2004; Thimme & Opitz 2007). Zusätzlich wurden virusspezifische CD8⁺ T-Zellen beschrieben, die eine regulatorische Funktion durch die Sekretion von IL-10 oder die Induktion von regulatorischen CD8⁺ T-Zellen ausüben, die den Transkriptionsfaktor FoxP3 und CD25 exprimieren (Billerbeck et al. 2007). Welchen Einfluss Treg-Zellen auf die Entwicklung des Versagens der CD8⁺ T-Zellen während der akuten Infektion ausüben, ist zurzeit noch unklar (Manigold et al. 2006).

1.6.4 „Escape“-Mutationen durch Selektionsdruck des Immunsystems

Durch den Selektionsdruck der zellulären Immunantwort entstehen Sequenzvarianten in Zielantigenen, die dazu führen, dass die veränderten

Antigenstrukturen durch T-Zellen nicht mehr erkannt werden. Diese Form des Selektionsdrucks wurde besonders für CD8⁺ T-Zellen beschrieben. CD8⁺ T-Zellen erkennen das virale Zielepitop im Zusammenhang mit den HLA-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche einer infizierten Zelle. Die genetisch determinierte Ausstattung mit HLA-Molekülen entscheidet daher darüber, welche Epitope eines Pathogens präsentiert und folglich durch CD8⁺ T-Zellen erkannt werden können. Mutationen in diesen HLA-spezifischen Epitopen können dazu führen, dass diese auf dem HLA-Klasse-I-Molekül nicht mehr präsentiert werden, oder dass der T-Zell-Rezeptor den Epitop-HLA-Klasse-I-Komplex nicht mehr erkennen kann. In beiden Fällen führen diese sogenannten „*Escape*“-Mutationen zu einem Versagen der Immunantwort und können zur Entwicklung einer chronischen Erkrankung beitragen. Ferner wurden in einer Reihe von Studien Mutationen in CD8⁺ T-Zell-Epitopen bei akuten HCV-Infektionen in Schimpansen und im Menschen nachgewiesen (Cox et al. 2005b; Kuntzen et al. 2007; Timm et al. 2004; Tester et al. 2005). Des Weiteren konnte die Anpassung von HCV an den Immundruck der T-Zellen dadurch beobachtet werden, dass Polymorphismen, die gezielt in HLA-spezifischen Sequenzen auftreten, zu einem Verlust der CD8 Zielepitope führen (Ray et al. 2005; Timm et al. 2007). Zusätzlich können auch Veränderungen außerhalb des Epitops zur veränderten Antigenprozessierung durch das Proteasom führen, die eine HLA-Präsentation verhindern (Seifert et al. 2004). In der Summe ist HCV also in der Lage, durch Selektion von Mutationen der Immunantwort zu entkommen. Allerdings ist nicht klar, welchen Beitrag insgesamt der zelluläre Selektionsdruck zur Evolution von HCV hat.

1.7 Ziel der Promotionsarbeit

Die Fähigkeit von HCV, sich durch Selektion von Mutationen rasch an die Änderungen der Replikationsbedingungen anzupassen, erschwert die Entwicklung neuer Therapien und Vakzine. Mutationen in Zielantigenen der humoralen und zellulären Immunantwort können dazu führen, dass die veränderte Antigenstruktur immunologisch nicht mehr erkannt wird. Diese Form des Selektionsdrucks unter der zellulären Immunantwort wurde besonders für CD8⁺ T-Zell-Epitope beschrieben. Allerdings ist unklar, welches Ausmaß diese Form der Anpassung an den zellulären Immundruck und welche Bedeutung die Selektion von Mutationen für den Verlauf der HCV-Infektion hat. Die so genannten „*Escape*“-Mutationen können zum Versagen

der Immunantwort führen und so zur Entwicklung einer chronischen Erkrankung beitragen. Zum anderen ist es aber auch denkbar, dass einige „*Escape*“-Mutationen mit einer Senkung der viralen Fitness assoziiert und so für die Kontrolle der Virusreplikation von Vorteil sind.

Ziel der Promotionsarbeit ist es, die Interaktion der zellulären Immunantwort mit der Evolution des Hepatitis C Virus in einer definierten Kohorte exakt zu charakterisieren. Dazu soll:

1. die Abhängigkeit der Virusevolution von der HLA-Klasse I-Ausstattung untersucht werden.
2. die Bedeutung von Mutationen in Zielepitopen von CD8⁺ T-Zellen charakterisiert werden.
3. die Bedeutung von Mutationen in Zielepitopen von CD8⁺ T-Zellen für die virale Fitness untersucht werden.

Grundlage für diese Untersuchungen ist eine große Kohorte von Patientinnen, die in den Jahren 1977/78 durch kontaminierte Anti-D-Immunglobuline mit einem identischen HCV-Isolat infiziert worden sind.

Im ersten Teil des Projekts soll untersucht werden, wie das Virus sich an die CD8⁺ T-Zell-Antwort anpasst. Hierfür werden HCV-Sequenzen der Patienten erstellt und auf ihre phylogenetische Zugehörigkeit überprüft. Des Weiteren analysieren wir die Verteilung der Mutationen innerhalb und außerhalb beschriebener Epitope in den Nicht-Strukturproteinen des Virus. Im zweiten Teil des Projekts soll der Einfluss der unter Immunselektionsdruck entstanden Mutationen auf die Erkennung durch CD8⁺ T-Zellen untersucht werden. Dazu werden *in vitro* antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen expandiert und mit unterschiedlichen synthetischen Peptiden stimuliert und anschließend die IFN- γ Sekretion am Durchflusszytometer gemessen. Im dritten Teil des Projekts soll der Einfluss von „*Escape*“-Mutationen auf die virale Fitness untersucht werden. Um die Replikationskapazität von „*Escape*“-Mutationen zu bestimmen, benutzen wir ein subgenomisches Replikon und ein HCV-Zellkultursystem. Die Mutationen sollen in das subgenomische-Replikon-Plasmid Con1 mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese integriert werden. Dieses Konstrukt dient als Vorlage und wird in RNA umgeschrieben, um dann mit Hilfe der

Elektroporation in eine humane Hepatoma-Zelllinie (Huh7) transferiert zu werden.
Der Nachweis der Replikation erfolgt über das Luziferase-Reportergen-System.

2 Material und Methoden

2.1 Substanzen und Lösungen

2.1.1 Reagenzien und Feinchemikalien

Deionisiertes Wasser (dH₂O) wurde in einer Nanopure-Anlage hergestellt. Alle verwendeten Chemikalien, die nicht im Folgenden aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck bezogen.

Agarose (für DNA-Gele)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Roche Diagnostic
APC mouse anti-human CD8	Becton Dickinson
Aqua-Roti-Phenol	Roth
Chloroform	J.T. Baker
DEPC-H ₂ O	Ambion
Dimethylsulfoxid	Roth
dNTPs	Promega
Essigsäure 100 %	Merck
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Roth
FACS-Clean	Becton Dickinson
FACS-Flow	Becton Dickinson
FACS-Rinse	Becton Dickinson
Ficoll	
FITC conjugated anti human IFN γ	eBioscience
Fix Perm	Becton Dickinson
Glycerol	Sigma-Aldrich

Interleukin-2, human (10.000U)	Roche
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Roth
LB-Agar	Becton Dickinson
LB-Medium	Roth
MgCl ₂	Merck
NaCl	Merck
Natrium Acetat 3M pH 5,5	Ambion
Orange G	Sigma-Aldrich
PE mouse anti-human CD3	Becton Dickinson
PE mouse anti-human CD4	Becton Dickinson
PercP Viaprobe	Becton Dickinson
Perm Wash	Becton Dickinson
Smart ladder	Eurogentech
TAE-Puffer ultrapure 10x	Gibco BRL/Invitrogen
Taq-Polymerase	Promega
TBE-Puffer ultrapure 10x	Gibco BRL/Invitrogen
X-Gal	Bio Solve LTD
α-CD28/CD49d	Becton Dickinson
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

2.2 Zellkulturmedien und Zusätze

1x PBS mit MgCl ₂ und CaCl ₂	Gibco BRL/Invitrogen
1x PBS, ohne MgCl ₂ und CaCl ₂	Gibco BRL/Invitrogen
DMEM (4500 mg/l Glucose) mit L-Glutamin	PAA Laboratories

DMEM/Nutrient Mix F-12	PAA
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrome
HEPES 1M	PAA
L-Glutamin (200mM)	PAA
Nichtessentielle Aminosäuren (100x)	PAA Laboratories
Optimem I reduced-Serum Medium	Gibco BRL/Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	PAA
RPMI 1640 mit L-Glutamin	PAA
Trypan Blue	Gibco BRL/Invitrogen
Trypsin/EDTA	PAA

2.3 Verbrauchsmaterialien

Kryoröhrchen, 2,0 ml	Greiner Bio-One
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson
Gene Pulser Cuvette (0,4 cm)	Bio Rad
Gewebekulturflaschen, steril	Greiner Bio-One
Gewebekulturplatten, steril	Greiner Bio-One
Gewebekulturplatten, 100 mm	Greiner Bio-One
Leucosep-Röhrchen	Becton Dickinson
Lonza Küvetten	Lonza
Minisart Plus Sterilfilter (0,2 µm)	Greiner Bio-One
Petrischalen, 100 mm	Greiner Bio-One
Pipetten, Plastik	Lonza
Reaktionsgefäß (1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf

2.4 Enzyme

Go Taq-Polymerase (1 U/μl)	Promega
AflIII	NEB GmbH
Clal	NEB GmbH
DNaseI	Roche
PvuI	NEB GmbH
ScaI	NEB GmbH
T4-DNA-Ligase (20 U/μl)	NEB GmbH

2.5 Kommerzielle Kits

High Speed Plasmid Maxi Kit	Qiagen
High Speed Plasmid Midi Kit	Qiagen
Mega Clear Kit	Ambion
MinElute Reaction Cleanup Kit	Qiagen
One-step PCR Kit	Qiagen
One-step RT-PCR Kit	Qiagen
pTOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
Qiamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
Qiamp Viral RNA Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QuickChange XL II Site-Directed	Qiagen
RNeasy Kit	Qiagen
StrataClone PCR Cloning Kit	Aglient Technologies
T cell Nucleofector II Transfection kit	Lonza
T7 Mega Script High Yield Transcription Kit	Ambion

2.6 Geräte

FACS calibur	Becton Dickinson
Gene Pulser II	Bio Rad
Microplate Scintillation and Luminescence counter	Packard
Mj mini Personal Thermal Cycler	Biorad
Nucleofector II	Lonza
Power Supply E132	Biorad
Trio Thermoblock	Biometra
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge 5804	Eppendorf

2.7 Computerprogramme und Internetseiten

ATGC	PhyML 3.0: newalgorithms, methods & utilities http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/
Bioedit	http://www.mbio.nscu.edu/bioedit.html
CodonCode Aligner	CodonCode Cooperation
FigTree v1.2.2	http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/
FlowJo 9.3	Tree Star, Inc. 1997-2008
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.
HCV Sequence Database	http://hcv.lanl.gov/
Mac OS X	Macintosh
MHC-I-binding-prediction	http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/
Microsoft Office	Microsoft
NCBI Homepage	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NEBcutter V2.0	http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php

R-Programm	http://www.R-project.org
Se-Al v2.0a11 Carbon	Sequence Alignment Editor v2.0a11 © 1996-2002 Andrew Rambaut
SISA The Fisher exact test	http://www.quantitativeskills.com/sisa/index.html
SNAP-Programm	synonymous-nonsynonymous analysis program (http://hcv.lanl.gov/)

2.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden kommerziell von Invitrogen und Biomers bezogen. Ihre Namen, Sequenzen und HCV-Genomregionen sind in Tabelle 2.1 angegeben.

Tabelle 2.1: Oligonukleotide

Oligonukleotide	Sequenz (5' → 3')	HCV-Genomregion
HCV1b_3c-as	CCAARTAAAGGTCCGAGCTGCC	NS3
HCV1b_3e-as	CGCCCGTGGTGATGGTCC	NS3
HCV1b_4c-s	CTATGGCAAAGCCATCCC	NS3
HCV3404s_neu	AGGGTGGCGACTCCTYGCK	NS3
NS3-913-s	ACRGTCCTGGACCAAGCR	NS3
sv693s_neu	CTACCCGTCTCCGCCCGVAGR	NS3
sv694as_neu	ATCCTRCCCACAATGACCACR	NS3
NS3 326-s	GGCATGCGYGATGTCATYCC	NS3
NS3 559-as	TRTCYGTGAAGACCGGGGAC	NS3
HCV1b_4d-s	GCATMTACAGGTTTGTGACTCC	NS3
B7_QP-s	GGACCTCGTCGGCTGGCCAGCGCCC	NS3/Con1
B7_QP-as	GGAACGCGCCCCGGGGGGCGCTGGC	NS3/Con1
B7_QP_PS-s	GGACCTCGTCGGCTGGCCAGCGCCC	NS3/Con1
B7_QP_PS-as	GGAACGCGCCCCGGAGGGCGCTGGC	NS3/Con1
B7_PS-s	GGACCTCGTCGGCTGGCAAGCGCCC	NS3/Con1
B7_PS-as	GGAACGCGCCCCGGAGGGCGCTTGC	NS3/Con1
Anti-D_7540-as	ACCARGACCCGTCGCTGAGRTC	NS4
HCV1b_4b-as	CATTAGAGCGTCTGTTGC	NS4A
HCV1b_4c-s	CTATGGCAAAGCCATCCC	NS4A
HCV1b_5d-s	CCCCACGCACTATGTGCC	NS4B
HCV1b_5d-as	GGGCAYTTTACGTTGTCRGTGG	NS4B
HCV1b_5b-as	AGCCGGTTCATCCACTGC	NS5A
HCV1b_6c-s	ATGGGCGGRAACATCACCCG	NS5A
HCV1b_6e-as	TARAGGGCCATYTTCTCGC	NS5B

HCV1b_7a-s	ACCGGGACGTGCTBAAGG	NS5B
HCV1b_7b-as	CTTYGCAGCTCGACAGGC	NS5B
HCV1b_7d-s	CACGGAGGCTATGACTAGG	NS5B
sv347as	AGGTAGGTCAAGTGGYTCAATG	NS5B
sv350as	GTGGAGTGTAATGCGCTAAG	NS5B
sv365s	GACTACGTCCCTCCMGTGGTAC	NS5B
sv394s	GTCGGCCGTCGACAGCGGCACRGCR	NS5B
AflIII_GFP-s	ATCGACTTAAGGAAGGCTACGTCCAG	NS5B/
Clal-GFP-as	TGACTATCGATGGTGCTCAGGTAGTG	NS5B/
Anti-D_Clal-as	CCGTTCATCGATTGGGGAGCAGRTAG	NS5B/Con1
Anti-D_AflIII-s	TCCCGACTTAAGCGACGGGTCTTGGT	NS5B/Con1
pacGFP-N1-	TCTCGAGCTCAAGCTTCCACCATGGG	pacGFP-N1
HindIII_Flu_B8HCV-s	CATCCTTGGCTTCGTCTTCACCCTCG CCGCGAAGCTGTCCGGC	
pacGFP-N1-KpnI-	CCGCGGTACCGTCGACTGGGTCGGG	pacGFP-N1
B8HCV-as	TCCAGGCTGAA	
M13s	CCAGGGTTTTCCAGTCACG	pCR 2.1. TOPO
M13as	CGGATAACAATTTACACAGG	pCR 2.1. TOPO

2.9 Peptide

Alle Peptide wurden kommerziell von Elephant & Peptides und EMC Microselection bezogen. Ihre Namen, Sequenzen und HCV-Proteine sowie die Position im Genom und das jeweils spezifische HLA-Allel sind in der Tabelle 2.2 angegeben.

Tabelle 2.2: Peptide

Peptide	Sequenz	Protein	Position	HLA-Allele
p110	GEMPSTEDL	NS4B	1871-1879	B40
p114	WPAPSGARSL	NS3	1111-1120	B07
p115	WPAPPGARSL	NS3	1111-1120	B07
p116	WQAPPGARSL	NS3	1111-1120	B07
p117	LLRHHNMVY	NS5B	2450-2458	B15
p118	LLRHHNLVY	NS5B	2450-2458	B15
p119	VLDDHYWDV	NS5B	2479-2487	A02
p120	VLDDHYRDV	NS5B	2479-2487	A02
p121	VLDDHYQDV	NS5B	2479-2487	A02
p122	VLDSHYQDV	NS5B	2479-2487	A02
p123	EMKAKASTV	NS5B	2490-2498	B08
p124	EVKAAASKV	NS5B	2490-2498	B08

p125	TVKARLLSV	NS5B	2497-2505	B08
p126	KLTPPHSAK	NS5B	2510-2518	A03
p128	SLTPPHSAK	NS5B	2510-2518	A03
p129	SLRVFTEAM	NS5B	2755-2763	B15
p130	SLRAFTEAM	NS5B	2755-2763	B15
p135	LLRHRNMVY	NS5B	2450-2458	B15
p136	LLRHRNLVY	NS5B	2450-2458	B15
p144	DNFPYLVAY	NS3	1581-1589	B18
p146	SQRQKKVTF	NS5B	2466-2474	B15
p148	APTLWARMVL	NS5B	2836-2845	B07
p232	SQRQRKVTF	NS5B	2466-2474	B15
p233	LLRYHNMVY	NS5B	2450-2458	B15
CEF-Pool *				
Flu-Peptid	GILGFVFTL	Influenza A	58-66	A02

* Der CEF- Pool besteht aus spezifischen Peptiden von drei verschiedenen Virenarten und deckt ein breites Spektrum an HLA-Allel-Klasse I- spezifischen Epitopen ab.

2.10 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> TOP10-Zellen	Invitrogen
XL-10 Gold Ultrakompetente Zellen	Stratagene

2.11 Virusisolate

Für die vorliegende Arbeit standen Serumproben von chronisch infizierten Patientinnen zur Verfügung (Tabelle 2.3). Diese hatten sich in den Jahren 1977 bis 1979 bei einer Behandlung mit dem gleichen HCV-kontaminierten Anti-D-Immunglobulin-Präparat infiziert (Dittmann et al. 1991). Alle Patienten wurden durch serologische Standards HLA-typisiert. Die RNA des Hepatitis C Virus des Stammes AD78 konnte aus den kontaminierten Immunglobulinen Ig8 und Ig12 isoliert werden.

Tabelle 2.3: Anti-D Kohorte Patientenliste

ID	HLA-Allel A		HLA-Allel B		HCV RNA	GT
AD002	2	24	25	57	positiv	1b
AD004	2	24	41	44	positiv	1b
AD006	3	24	7	51	positiv	1b
AD007	2	23	44	73	positiv	1b
AD008	2	3	7	35	positiv	1b
AD009	1	25	18	57	positiv	1b
AD010	24	68	44	57	positiv	1b
AD012	11	24	15	40	positiv	1b
AD017	1	1	8	18	positiv	1b
AD019	1	33	8	14	positiv	1b
AD021	2	2	18	44	positiv	1b
AD022	2	3	27	57	positiv	1b
AD025	3	3	7	7	positiv	1b
AD026	1	2	35	44	positiv	1b
AD046	24	0	27	40	positiv	1b
AD049	2	3	27	51	positiv	1b
AD052	2	74	7	35	positiv	1b
AD063	2	2	40	57	positiv	1b
AD069	26	68	49	44	positiv	1b
AD103	2	31	15(62)	40(60)	positiv	1b
AD106	2	32	7	44	positiv	1b
AD108	1	3	15(62)	49	positiv	1b
AD111	11	24	35	35	positiv	1b
AD118	1	26	8	38	positiv	1b
AD119	3	3	7	35	positiv	1b
AD123	2	24	44	51	positiv	1b
AD141	1	3	8	35	positiv	1b
AD155	3	3	7	7	positiv	1b
AD177	3	26	27	38	positiv	1b
AD178	1	2	15	35	positiv	1b
AD200	2	24	7	27	positiv	1b
AD201	1	2	8	51	positiv	1b
AD204	1	2	8	57	positiv	1b
AD206	3	23	44	51	positiv	1b
AD211	3	23	35	44	positiv	1b
AD213	2	2	7	15(62)	positiv	1b
AD214	1	2	41	44	positiv	1b
AD221	2	3	15(62)	51	positiv	1b
AD222	3	3	7	27	positiv	1b

AD226	1	2	7	37	positiv	1b
AD231	2	11	40(60)	52	positiv	1b
AD237	3	26	44	44	positiv	1b
AD239	1	25	8	35	positiv	1b
AD245	25	32	18	44	positiv	1b
AD250	1	30	8	18	positiv	1b
AD267	3	24	14	15	positiv	1b
AD286	2	2	13	15(62)	positiv	1b
AD294	2	24	13	37	positiv	1b
AD311	1	3	8	18	positiv	1b
AD312	1	23	35	55	positiv	1b
AD314	3	24	51	56	positiv	1b
AD333	1	2	8	35	positiv	1b
AD334	1	25	15(62)	57	positiv	1b
AD336	3	30	8	35	positiv	1b
AD337	2	30	13	44	positiv	1b
AD341	2	2	7	40(61)	positiv	1b
AD342	3	11	14(65)	39	positiv	1b
AD345	24	24	35	35	positiv	1b
AD350	2	31	7	51	positiv	1b
AD352	2	24	7	40(61)	positiv	1b
AD356	1	26	38	51	positiv	1b
AD357	3	26	7	44	positiv	1b
AD364	1	24	8	51	positiv	1b
AD365	2	23	44	51	positiv	1b
AD367	25	29	18	44	positiv	1b
AD370	3	11	13	35	positiv	1b
AD372	2	30	13	44	positiv	1b
AD379	1	11	8	38	positiv	1b
AD380	2	32	13	44	positiv	1b
AD382	1	2	35	40(61)	positiv	1b
AD383	1	1	13	57	positiv	1b
AD385	2	2	13	15(62)	positiv	1b
AD390	2	2	44	51	positiv	1b
AD392	23	24	44	51	positiv	1b
AD400	2	2	7	18	positiv	1b
AD404	2	2	27	40	positiv	1b
AD406	24	26	7	38	positiv	1b
AD407	2	2	44	50	positiv	1b

Tabelle 2.4: Patienten mit intravenösem Drogenabusus.

ID	HLA-Allel A		HLA-Allel B		HCV RNA	GT
IVDU020	25	31	15(63)	44	positiv	4d
IVDU113	2	31	15(62)	51	positiv	3a
IVDU126	2	32	15(63)	44	positiv	1a
IVDU131	24	30	7	15(62)	negativ	-
IVDU133	2	2	15(71)	44	positiv	1a
IVDU141	1	2	15(62)	18	positiv	-
IVDU146	30	69	13	15(63)	negativ	-
IVDU147	24	25	15(62)	18	positiv	1b
IVDU149	2	2	15(62)	44	negativ	-
IVDU173	3	68	7	44	positiv	1b
IVDU176	2	31	15(62)	51	positiv	3a
IVDU191	3	26	15(62)	38	positiv	4d
IVDU191	3	26	15(62)	38	positiv	4d
IVDU193	1	2	8	15(62)	negativ	-
IVDU193	1	2	8	15(62)	positiv	-
IVDU194	1	2	40(60)	44	negativ	3a
IVDU198	23	24	15(72)	18	negativ	-
IVDU199	2	68	15(62)	40(60)	positiv	1a
IVDU200	25	68	18	44	negativ	-
IVDU204	24	26	15(62)	27	positiv	1a
IVDU205	2	2	13	15(62)	positiv	-
IVDU210	1	2	15(62)	35	positiv	1b
IVDU213	3	68	7	15(62)	positiv	-
IVDU214	24	25	15(62)	18	positiv	1b
IVDU223	1	3	8	15(62)	positiv	1a
IVDU224	2	23	15(62)	18	positiv	-
IVDU225	2	24	14(65)	15(62)	positiv	-
IVDU226	11	14	15(62)	15(62)	positiv	-
IVDU229	2	32	15(62)	40(61)	positiv	3a
IVDU235	2	29	7	15(62)	positiv	1a

Alle Patienten wurden durch serologische Standards HLA-typisiert.

2.12 Plasmide und Vektoren

2.12.1 pFK-I₃₄₁PI-Luc/NS3-3'/Con1/ET

Das HCV-Plasmid pFK-I₃₄₁PI-Luc/NS3-3'/Con1/ET (Abbildung 2.1) wurde von Prof. Ralf Bartenschlager (Hygiene Institut, Abteilung Molekulare Virologie, Universität

Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Im Gegensatz zu dem pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/Con1/ET wurde allerdings das Neomycinphosphotransferasegen durch einen Sequenzabschnitt ersetzt, der aus der 341 nt-langen 5'-NTR des HCV, einem 63 bp-langen Spacer-Element, einer Poliovirus-IRES und dem Leuchtkäfer (*Photinus vulgaris*) -Luziferase-Gen besteht (Krieger et al. 2001).

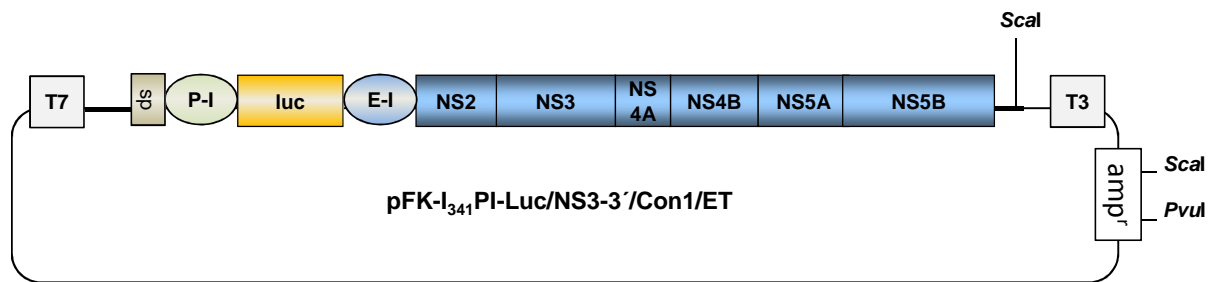


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Plasmids pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/Con1/ET. Das Plasmid beinhaltet Sequenzen des subgenomischen HCV-Replikons Con1. Zur *in vitro*-Transkription sind in dem Plasmid die Promotorsequenzen T3 und T7 enthalten sowie das Ampicillinresistenzgen zur Selektion transformierter Zellen. Die relevanten Schnittstellen von Endonukleasen (*Scal*, *PvuII*) zur Linearisierung des Plasmids sind angegeben.

2.12.2 Kommerzielle Vektoren

pCR®2.1.-Topo 3,9 kb	Invitrogen
pAcGFP1-N1 4,7 kb	Clontech

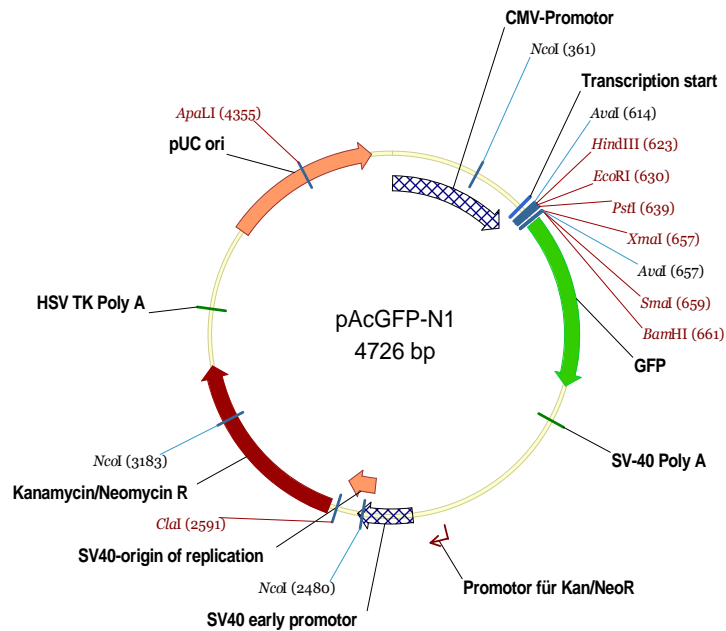


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des pAcGFP-N1-Vektors. Der Vektor verfügt über einen CMV-Promotor, dem Reportergen GFP sowie den Resistenzgenen Kanamycin und Neomycin und einer multiplen Klonierungsseite (MCS).

2.12.2.1 Vektor pAcGFP-HCV-Flu-A2 Epitop-HCV

Um die flankierenden Regionen der HCV-spezifischen CD8 Epitope zu untersuchen wurde ein Vektor basierend auf dem pAcGFP1-N1-Vektor generiert. Ein Fragment von 273 bp wurde in die MCP des Vektors integriert. Dieses Fragment enthält die flankierenden Regionen eines immundominanten HCV-spezifischen CD8-Epitops und das Influenza-spezifische CD8-Epitop GILGFVFTL₅₈₋₆₆. Zur Optimierung der GFP-Expression wurde zusätzlich eine 4G-Linker-Region zwischen das Fusionsfragment und dem GFP eingebaut (Abbildung 2.3).

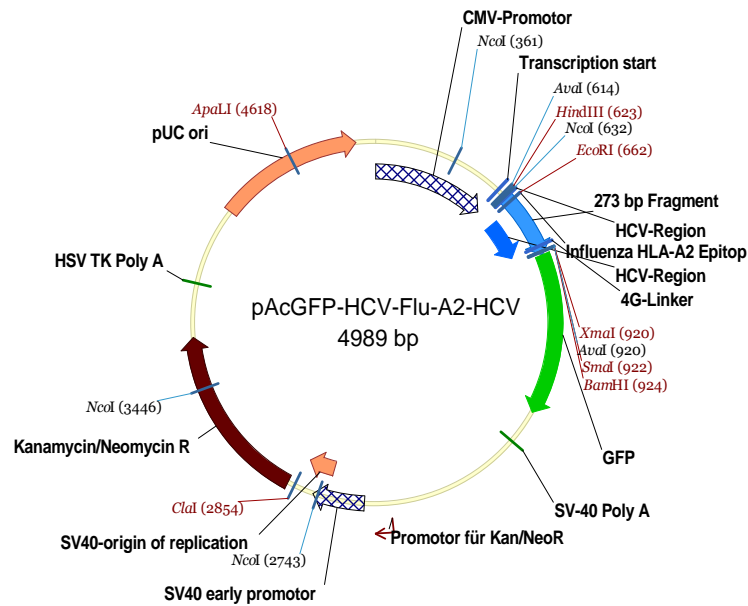


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Vektors: pAcGFP-HCV-Flu-A2-HCV. Der Vektor verfügt über einen CMV-Promotor, dem Reportergen GFP sowie den Resistenzgenen Kanamycin und Neomycin und einer multiplen Klonierungsseite (MCS). Zwischen der Restriktionsschnittstelle *Hind* III und *Kpn* I wurde das ca. 273 bp große Fragment eingebaut. Dieses beinhaltet die C-terminale Region des immundominanten HCV-spezifischen CD8-Epitops, das A2-Flu-Epitops GILGFVFTL, die N-terminale Region des HCV-spezifischen CD8-Epitops sowie den 4G-Linker.

2.13 Humane Zelllinie

2.13.1 Humane Hepatomzelllinie Huh7

Die Huh7-Zelllinie ist eine humane, adhärente Hepatomzelllinie, die aus einem hepatozellulären Karzinom etabliert wurde (Nakabayashi et al. 1982). Die Zelllinie wurde von Prof. Ralf Bartenschlager (Hygiene Institut, Abteilung Molekulare Virologie, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

2.13.2 Lunet-Zellen

Es handelt sich hier um Huh7-Zellen, die mit HCV-Replikon-RNA infiziert wurden. Durch die anschließende Interferon- α -Behandlung konnte eine Population von Zellen selektiert werden, die in der Lage ist, die Replikation von HCV-Molekülen effektiver zu unterstützen als ursprüngliche Huh7-Zellen.

2.14 Lösungen und Puffer

Tabelle 2.5: Pufferansätze

Bezeichnung	Endkonzentration
Einfriermedium	90 % FCS
	10 % DMSO
PBS	155 mM NaCl
	3 mM Na ₂ HPO ₄
TBE-Puffer (1x)	100 mM Tris
	90 mM Borsäure
	1 mM EDTA
	pH 8,4
Waschpuffer (FACS)	PBS
	10 % (v/v) FCS
DNA-Ladepuffer	5,5 mM Orange G
	1,2 M Saccharose

Tabelle 2.6: Medium und Agarplatten zur Kultivierung von *E.coli*-Bakterien

Bezeichnung	Endkonzentration
LB-Medium	25 g LB-Medium Pulver
LB-Agar	1 l dH ₂ O
	25 g LB-Medium Pulver
	15 g Bacto Agar
	1 l dH ₂ O

Tabelle 2.7: Kulturmedium für Huh7-Zellen

Bestandteil	Endkonzentration
DMEM	-
FCS	10 %
HEPES	10 mM
Nichtessentielle Aminosäuren	1x
L-Glutamin	2 mM
Penicillin/Streptomycin	Pen.:100 U/ml, Strep.: 100 µg/ml

Tabelle 2.8: Kulturmedium für PBMCs

Bestandteil	Endkonzentration
RPMI 1640	-
FCS	10 %
HEPES	10 mM
Penicillin/Streptomycin	Pen.:100 U/ml, Strep.: 100 µg/ml

2.15 Zellbiologische Methoden

2.15.1 Aufbereitung von peripherem Vollblut aus Serum- und EDTA-Monovetten

Die Serum- und EDTA-Monovetten wurden für 15 min bei 1800 rpm zentrifugiert und jeweils ca. 1,5 ml Serum vorsichtig auf ein 2 ml Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden dann bei -80 °C eingefroren. Der Plasmaüberstand wurde auf die gleiche Weise behandelt. Zusätzlich wurde noch je 1,0 ml der zentrifugierten Blutzellen aus den EDTA-Monovetten in Kryoröhrchen überführt und bei -20 °C eingefroren.

2.15.2 Isolierung der PBMC aus peripherem Vollblut

Zur Isolierung von PBMCs standen uns Blutproben von Patienten mit intravenösem Drogenabusus (IVDU) und *Buffy-coats* von Blutspendern zur Verfügung.

Auf die Membran eines Leucosep-Röhrchens wurden 15 ml Ficoll gegeben und kurz zentrifugiert. Das venöse Blut aus einer EDTA-Monovette wurde mit serumfreien RPMI 1640 Medium verdünnt, auf die Membran des Leucosep-Röhrchen gebracht und für 10 min bei 2200 rpm zentrifugiert. Der komplette Überstand oberhalb der Membran (Blutplasma, Lymphozyten, Monozyten, etc.) wurde in ein neues 50 ml-Falconröhrchen überführt und mit serumfreien RPMI 1640 Medium aufgefüllt. Anschließend wurde bei 1800 rpm für 10 min zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt und die Zellen wurden entweder eingefroren oder die Lebendzellzahl bestimmt und die entsprechenden Analysen durchgeführt.

2.15.3 Kryokonservierung von Zellen

Vor dem Einfrierprozess wurde die Kultur auf Mykoplasmen getestet. Das Zellpellet wurde im Einfriermedium resuspendiert und je nach Zellzahl in Kryoröhrchen aliquotiert. In einem mit 100 % Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter wurden die Aliquots ü.N. bei -80 °C eingefroren und am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff eingelagert.

Zum Auftauen der Proben wurde die gefrorene Zellsuspension kurz bei 37 °C angetaut, in 1 ml FCS aufgenommen und in ein 15 ml-Falconröhrchen mit 10 ml Zellmedium überführt. Danach wurden die Zellen bei 1800 rpm für 7 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet noch zweimal mit serumfreien RPMI 1640 Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für weitere Analysen verwendet.

2.15.4 Kultivierung von Huh7-Zellen

Die adhärenenten Huh7-Zellen wurden in *Dulbeccos modified Eagles Medium* (DMEM) kultiviert, welches zusätzlich mit L-Glutamin, nichtessentiellen Aminosäuren, Penicillin/Streptomycin, HEPES und FCS versetzt war (Tabelle 2.7). Die Zellen wurden je nach Konfluenz in einem Verhältnis 1:2 bis 1:4 passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit 20 ml PBS gewaschen und komplett abgenommen. Anschließend wurde der Zellrasen mit 2,5 ml Trypsin/EDTA komplett bedeckt und nach ca. 3 min wieder abgenommen. Nach weiteren 3-5 min konnten die Zellen durch leichtes Klopfen abgelöst werden. Die Zellen wurden in einem entsprechenden Volumen frischen Mediums aufgenommen und auf die neuen Kulturflaschen verteilt.

2.15.5 Transfektion von Huh7-Zellen durch die Elektroporation

Für die Transfektion mittels der Elektroporation wurden Huh7-Zellen mit einer Wachstumsdichte von ca. 70 % verwendet. Für vier Transfektionsansätze wurden zwei Kulturflaschen (75 cm²) verwendet. Die Zellen wurden wie beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst und in 30 ml kompletten DMEM bei 1200 rpm für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde einmal mit 30 ml PBS und einmal mit 30 ml Optimum wiederholt. Das Zellpellet wurde dann in 500 µl/Ansatz Optimum resuspendiert. Die 500µl Zellsuspension wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 10 µg RNA vermischt und in die Elektroporationsküvette überführt. Diese wurde dann für 10 min auf Eis gestellt. Die Elektroporation wurde durch einen Impuls von 270 mV und 975 µF mit der Gene Pulsar II Apparatur durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen in komplettes DMEM überführt und in 6-well Kulturplatten ausplattiert. Für die transiente Transfektion wurde die Luziferaseaktivität nach 4, 24, 48 und 72 Stunden gemessen. Für die Messungen nach 48, 72 und 96 Stunden wurde eine Verdünnung von 2 ml der Zellsuspension berücksichtigt. Die Ergebnisse wurden in Relation der Luziferaseaktivität nach vier Stunden analysiert.

2.15.6 Transfektion von PBMCs durch die Elektroporation

Die PBMCs eines *Buffy-coats* wurden wie bereits beschrieben aufgetaut und 24h über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend gezählt. Pro Transfektionsansatz wurden 7x10⁶ Zellen benötigt. Der Überstand wurde komplett entfernt und die Zellen wurden in 100 µl N-Solution der Firma Lonza resuspendiert. Zusätzlich wurde 7,5 µg Vektor-DNA zugefügt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Nucleofector II. Nach maximal 15 min Inkubation bei RT wurde die Zellsuspension in die Küvetten überführt und mit einem ausgewählten Programm transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen in 5 ml RPMI Medium aufgenommen, zentrifugiert für 5 min bei 1500 rpm und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 6-well Kulturplatten oder in 25 cm² Zellkulturflaschen überführt.

2.16 Molekularbiologische Methoden

2.16.1 Isolation von DNA

2.16.1.1 Patientenblut

Für die Extraktion von DNA wurden die Patientenproben mit dem Qiamper Blood Mini Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und die DNA extrahiert. Die Proben wurden bei -20 °C eingefroren.

2.16.2 Isolation von RNA

2.16.2.1 Serum

Virale RNA aus humanem Serum (wahlweise auch Plasma) wurde mit dem Qiamper Viral RNA Kit nach Herstellerangaben isoliert und bei -80 °C eingefroren.

2.16.3 Qualitative RT-PCR

2.16.3.1 Analyse von HCV-Fragmenten

Die RT-PCR ermöglichte die Analyse der HCV-Fragmente NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B aus Patientenserum, die mit Hilfe der Sequenzierung nachgewiesen werden konnten. Dazu wurde eine Kombination aus RT- und *nested*-PCR durchgeführt. Die isolierte HCV-RNA wurde in cDNA transkribiert und direkt amplifiziert. Der PCR-Ansatz erfolgte mit Hilfe des One-step-PCR Kits.

Tabelle 2.9: Ansätze und Bedingungen der Reversen Transkription

Reverse Transkription 1. PCR

Ansatz 25 µl		Programm			
			Zyklen	Temperatur	Zeit
<i>a.dest</i>	11 µl	RT	1	50 °C	30 min
5x Puffer	5 µl	Denaturierung	1	95 °C	15 min
dNTPs	1 µl	Denaturierung	35	94 °C	60 sec
Primer s	1 µl	Annealing		56 °C	60 sec
Primer as	1 µl	Elongation		72 °C	120 sec
RT-Taq	1 µl	finale Elongation	1	72 °C	10 min
RNA-Probe	5 µl				

Tabelle 2.10: Ansätze und Bedingungen der nested-PCR2. *nested*-PCR

Ansatz 50 µl		Programm			
			Zyklen	Temperatur	Zeit
<i>a.dest</i>	29	Denaturierung	1	94 °C	120 sec
5x Puffer	14	Denaturierung	30	94 °C	60 sec
dNTPs	1	Annealing		55 °C	60 sec
Primer s	1	Elongation		72 °C	120 sec
Primer as	1				
Go-Taq	1	finale Elongation	1	72 °C	15 min
cDNA-Probe	3				

Die cDNA wurde vor Verwendung 1:10 verdünnt. Die Primer wurden in beiden PCR-Ansätzen mit einer Konzentration von 10 pmol/µl verwendet.

Tabelle 2.11: Primerkombinationen für die RT-PCR und die nested-PCR.

Primer RT-PCR	Primer <i>nested</i> -PCR	HCV-Fragment
sv693s_neu/ NS3-1113-as	HCV3404s_neu/ NS3-1058-as	NS3 3000-4173nt
sv697s/ sv694as_neu	NS3-913-s/ sv696as	NS3 3639-5040nt
5220s/ 7586as	5276s/ 7540as	NS4 4878-7251nt
sv365s/ sv350as	sv394s/ sv347as	NS5B 6915-8661nt

Die Paare sind in die zu untersuchenden HCV-Fragmente aufgeteilt.

2.16.4 Aufreinigung von DNA Fragmenten

Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte mit dem MinElute Reaction Cleanup Kit nach Herstellerangaben und wurde in 50 µl sterilen *a. dest* eluiert.

2.16.5 Agarosegelelektrophorese und Agarosegelextraktion von DNA Fragmenten

Die Agarosegelelektrophorese wurde in einem 1-2 %igen Agarosegel bei 100 V für 45-60 Minuten durchgeführt. Die Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben.

2.16.6 Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pCR 2.1 TOPO

Die Ligation von aufgereinigten PCR-Fragmenten in den pCR 2.1 TOPO erfolgte nach Herstellerangaben des TOPO TA Cloning Kit. Der linearisierte Vektor besitzt

einzelne Desoxythymidinreste, die am 3'-Ende überhängen. An die PCR-Fragmente wurden am 3'-Ende überhängende Desoxyadenosinreste angehängt. Mit Hilfe der Topoisomerase I wurden die PCR-Fragmente mit dem Vektor ligiert.

2.16.7 Zielgerichtete Mutagenese (SDM)

Mit der zielgerichteten Mutagenese wurden einzelne Punktmutationen in die Plasmid-Sequenz mit Hilfe des *Quick-change site-directed mutagenesis kit* gesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben in einem Endvolumen von 50 µl.

Tabelle 2.12: Bedingungen im Thermocycler

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95 °C	1 min
18	95 °C	50 sec
	60 °C	50 sec
	68 °C	1 min/kb der Plasmidlänge
1	68 °C	7 min

Das PCR-Produkt wurde mit 1 µl *DpnI* für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, um überschüssige und unspezifische DNA zu verdauen. Anschließend konnte die Transformation in XL-gold-Zellen erfolgen.

2.16.8 Transformation von kompetenten *E. coli*

2.16.8.1 Transformation von kompetenten XL-gold Zellen

Die Transformation mit den kompetenten XL-gold Zellen erfolgte nach Herstellerangaben des *Quick-change site-directed mutagenesis kit*.

2.16.8.2 Transformation von Top10-Zellen

Die Transformation mit dem pCR 2.1 TOPO-PCR-Fragment und den Top10-Zellen erfolgte mit Hilfe der Hitze-Schock-Methode, wie vom Hersteller angegeben. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit 100 mg/l Ampicilin ausplattiert. Für eine Blau-weiß-Selektion wurde die LB-Agarplatte zusätzlich mit 2 %igen X-Gal gleichmäßig bedeckt. Durch Insertion eines DNA-Fragments in den Vektor wird die Kodierung des LacZ-Gens unterbrochen, und nach Zugabe von X-Gal bleibt der Klon weiß. Kommt es zur Expressierung des α -Fragments, das von dem LacZ-Gen kodiert

wird, färbt sich der Klon blau. Diesen Vorgang bezeichnet man als α -Komplementation.

2.16.9 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Plasmid-DNA wurde in LB-Medium und entsprechenden Antibiotika (Ampicillin bzw. Kanamycin) angesetzt und ü.N. kultiviert. Die Präparation erfolgte mit dem High Speed Plasmid Midi Kit oder dem HiSpeed Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben.

2.16.10 Restriktion und Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA

2.16.10.1 Linearisierung von Plasmid-DNA vor der *in vitro*-Transkription von HCV-Replikon-RNA

Die Plasmide pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/Con1/ET und pFK-I₃₈₉luc/NS3-3'/Con1/ET sowie die daraus basierenden Konstrukte wurden mit den Restriktionsenzymen *Pvu*I und *Sca*I nach Herstellerangaben ü.N. linearisiert. Die Restriktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.16.10.2 Phenol/Chloroform-Aufreinigung von Plasmid-DNA

Die linearisierte Plasmid-DNA wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit Roti-Phenol angereichert und für 10 Minuten mit 12.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, mit einem Phenol-Chloroform-Gemisch versetzt und wieder für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach Abnahme der wässrigen Phase wurde 500 µl Chloroform zugegeben (Verhältnis 1:1). Nach erneuter Zentrifugation und wiederholter Abnahme der wässrigen Phase wurde Isopropanol zugegeben (Verhältnis 1:1) sowie 50 µl 3 M Natriumacetat und 1,5 µl Glyco Blue. Anschließend wurde durch Inkubation bei -80 °C für 30 Minuten die DNA gefällt. Nach Zentrifugation (10 min, 12.000 rpm) wurde der Überstand vorsichtig verworfen und das nun blaue, sichtbare Pellet mit 70 % EtOH mindestens zweimal gewaschen (10 min, 12.000 rpm). Das DNA-Pellet wurde dann in 15 µl DEPC-H₂O gelöst.

2.16.10.3 *In vitro*-Transkription zur Herstellung von HCV-Plasmid-RNA

Nach der Phenol/Chloroform-Aufreinigung wurde die linearisierte Plasmid-DNA als Matrize in einer *in vitro* Transkription von RNA mit dem T7 Mega Script High Yield Transcription Kit eingesetzt.

Tabelle 2.13: *in vitro*-Transkription

Mix	20 µl Ansatz
Matrize Plasmid-DNA	5 µg
10x Reaktionspuffer	2 µl
ATP-Lösung	2 µl
CTP-Lösung	2 µl
GTP-Lösung	2 µl
UTP-Lösung	2 µl
Enzym-Mix	2 µl
<i>a.dest</i>	auffüllen auf 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde für vier Stunden bei 37 °C inkubiert und für den anschließenden DNA-Abbau mit 1 µl DNaseI nochmals für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung der transkribierten Replikon-RNA erfolgte mit dem Mega Clear Kit nach Herstellerangaben und wurde bei -80 °C eingefroren.

2.17 Luziferase-Assay

Der Nachweis der Replikation von HCV-Replikonkonstrukten in Huh7-Zellen erfolgte durch den Nachweis der Luziferaseaktivität. Das Enzym katalysiert in Gegenwart von Mg^{2+} die Umsetzung von Luziferin. Dieses reagiert mit molekularem Sauerstoff, wobei Licht in einer Wellenlänge von 560 nm ausgesendet wird. Die entstandene Lichtintensität lässt sich detektieren und quantifizieren und ist proportional zur Replikation des Luziferase/HCV-Replikonkonstruktes. Die Huh7-Zellen wurden in 6-well Kulturplatten zweimal mit 1x PBS (+ $CaCl_2$, + $MgCl_2$) gewaschen. Je well wurden 200 µl 1x PBS (+ $CaCl_2$, + $MgCl_2$) und je 200 µl Lucilite-Luminescence-Substratlösung hinzugegeben und für fünf Minuten bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Zelllysate durch Resuspendieren auf je vier wells einer schwarzen 96-well Kulturplatte aufgeteilt. Die Messung erfolgte im Top Count NXT.

2.18 Immunologische Methoden

2.18.1 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ermöglicht die Identifizierung und das Sortieren von heterogenen Zellpopulationen wie Lymphozyten aufgrund ihrer Oberflächenantigene.

Dabei werden spezielle Oberflächenproteine und intrazelluläre Proteine der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Mit Hilfe des fluoreszenzaktivierten Zellsorter (*fluorescence-activated cell sorter*, FACS) können die einzelnen Zellen identifiziert, charakterisiert und separiert werden.

2.18.2 Färbung von Oberflächenproteinen

Es wurden 1×10^6 Zellen abgenommen und für fünf Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend mit 1x PBS/ 1 % FCS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 μ l 1x PBS/ 1 % FCS und konjugiertem Antikörper gegen verschiedene Oberflächenmoleküle (Tabelle 2.14) aufgenommen und 20 min bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden die gefärbten Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und das Zellpellet in 200 μ l 1x PBS aufgenommen.

Tabelle 2.14: Die eingesetzten Verdünnungen der Antikörper für die Phenotypisierung der Zellen.

Antikörper	Verdünnung
α -CD4 PE	1:100
α -CD8 APC	1:100
α -IFN- γ FITC	1: 40
α -CD3 PercP	1:100
α -Viaprobe PercP	1:100

2.18.3 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Um die Produktion von Zytokinen in den Zellen zu untersuchen, müssen die Zellen zunächst zur Zytokinproduktion angeregt und die Sekretion verhindert werden, so dass die Zytokine in den Zellen akkumulieren. Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurden 4×10^6 PBMC in 1 ml Medium auf einer 24-well Kulturplatte ausplattiert und in Anwesenheit von HCV-Peptiden (1 μ g/ml), humanem IL-2 (50 IU/ml) und anti-CD28/49 (1 μ l/ml) für 10 Tage expandiert. Je nach Expansion erfolgten nach sechs Tagen ein Mediumwechsel und nochmals die Zugabe von humanem IL-2 (50 IU/ml). Nach 10 Tagen wurden etwa $0,4 \times 10^6$ PBMC in 100 μ l Medium mit den HCV-Peptid und in Anwesenheit von Brefeldin A (BFA) (1 μ g/ml) für fünf Stunden bei 37 °C restimuliert. Durch die Peptide kommt es zu einer Stimulation des T-Zellrezeptors und der damit verbundenen Zytokinsynthese. BFA blockiert den vesikulären Proteintransport vom rauen ER zum Golgiapparat und führt zu einer Akkumulation

von Zytokinen in der Zelle. Als Positivkontrolle wurden Zellen parallel mit dem CEF-Pool stimuliert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit kaltem 1x PBS/ 1 % FCS gewaschen (5 min, 1500 rpm). und die Oberflächenmoleküle, wie bereits in Abschnitt 2.18.2 beschrieben gefärbt. Danach erfolgte die Fixierung, Permeabilisierung und die Färbung intrazellulärer Proteine mit der CytoFix/Cytoperm-Lösung nach Herstellerangaben. Durch die Permeabilisierung können zielgerichtete Antikörper gegen intrazelluläre Proteine, in die Zelle eindringen und binden. Die Zellen wurden in einem Volumen von 200 µl PBS aufgenommen und mit Hilfe des FACS Calibur analysiert.

2.19 Sequenzanalysen

2.19.1 Sequenzierungen

Sequenzierungen wurden von der Firma LGC Genomics durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 2.1 aufgelistet. Die Sequenzen der Anti-D Kohorte sind über die öffentliche HCV-Datenbank verfügbar (Zugangsnummer HQ908282-HQ908359 sowie JN377747-JN377781)

2.19.2 Erstellung phylogenetischer Bäume

Die phylogenetischen Bäume wurden nach der „Maximum-Likelihood“ (ML) Methode mit Hilfe der Software PhyML 3.0 erstellt. Es wurden Nukleotidsequenzen der NS3-NS5b-Region der Anti-D Kohorte sowie 40 HCV-Referenzsequenzen aus Deutschland des GT 1b verwendet. Die verwendeten Referenzsequenzen sind auf der öffentlichen HCV-Datenbank <http://hcv.lanl.gov/> erhältlich. Die Zuverlässigkeit der phylogenetischen Bäume wurde durch die Bootstrap-Analyse ausgewertet. Eine Bootstrap-Analyse wurde auf Grundlage von 100 zufälligen Replikaten des Datensatzes durchgeführt. Anhand der verschiedenen neu-angeordneten Sequenzgruppierungen kann abgeschätzt werden, wie eine unterschiedliche Reihe an Sequenzen desselben Genes und derselben Spezies die Validierung des phylogenetischen Baumes beeinflusst

2.20 Statistische Analysen

Die Nukleotid-Sequenzen der Anti-D-Patienten wurden für die Analysen der verschiedenen Mutationen verwendet. Die Mutationen wurden aufgeteilt in synonyme (s) und nicht-synonyme (ns)-Mutationen. Durch das Erstellen eines Algorithmus mit

dem Programm R (Team RDC) wurden alle Mutationen zu Ihren Positionen innerhalb oder außerhalb beschriebener CD8-Epitope zugeordnet (Tabelle 2.15). Diese Analyse wurde bei allen individuellen Patienten-Sequenzen durchgeführt. Die Mutationsraten wurden mit dem Graphik-Programm Prism bearbeitet und dabei das statistische Model, *1-way analysis of variance* ANOVA und die Bonferroni-Korrektur angewandt (p-Wert < 0,05).

Tabelle 2.15: Beschriebene HCV-spezifische CD8-Epitope in den Nicht-Strukturproteinen NS3 bis NS5B.

Position	Protein	HLA-Allel	Peptidgröße	Konsensussequenz GT 1b	Konsensussequenz Anti-D
1031-1039	NS3	A24	9	AYSQQTRGL	AYSQQTRGL
1038-1047	NS3	A2	10	GLLGCIITSL	GLLGCIITSL
1053-1061	NS3	B38	9	NQVEGEVQI	NQVEGEVQV
1073-1081	NS3	A2	9	CINGVCWTV	CVNGVCWTV
1080-1088	NS3	A66	9	TVYHGAGTR	TVFHGAGSK
1100-1108	NS3	A24	9	MYTNVDQDL	MYTNVDQDL
1111-1120	NS3	B7	10	WPAPSGARSL	WPAPSGARSL
1123-1315	NS3	A1	9	CTCGSSDLY	CTCGSSDLY
1131-1139	NS3	A2	9	YLVTRHADV	YLVTRHADV
1169-1177	NS3	A2	9	LLCPAGHAV	LLCPSGHV
1175-1183	NS3	A68	9	HAVGLFRAA	HVVGIFRAA
1193-1201	NS3	B40	9	VDFVPVESH	VDFVPVESH
1227-1236	NS3	A3	10	HLHAPTGSBK	HLHAPTGSBK
1261-1270	NS3	A11	10	TLGFGAYMSK	TLGFGAYMSK
1262-1270	NS3	A3	9	LGFGAYMSK	LGFGAYMSK
1265-1274	NS3	A11	10	GAYMSKAHGV	GAYMSKAHGV
1273-1282	NS3	A2	10	GVDPNIRTGV	GVDPNIRTGV
1287-1296	NS3	A2	10	TGSPITYSTY	TGSPITYSTY
1291-1299	NS3	A24	9	ITYSTYCKF	ITYSTYCKF
1292-1300	NS3	A24	9	TYSTYCKFL	TYSTYCKFL
1318-1327	NS3	B38	10	CHAQDATTVL	CHSTDSTSL
1320-1329	NS3	B35	10	STDATSILGI	STDSTSLGI
1359-1367	NS3	B35	9	HPNIEEVAL	HPNIEEVAL
1373-1380	NS3	B51	8	IPFYGKAI	IPFYGKAI

1383-1391	NS3	A26	9	ETIKGGRHL	ETIKGGRHL
1391-1399	NS3	A3	9	LIFCHSKKK	LIFCHSKKK
1395-1403	NS3	B8	9	HSKKKCDEL	HSKKKCDEL
1402-1410	NS3	B8	9	ELAAKLVAL	ELAAQLSGL
1406-1415	NS3	A2	10	KLVALGINAV	QLSGLGINAV
1409-1417	NS3	A3	9	ALGINAVAY	GLGINAVAY
1436-1444	NS3	A1	9	ATDALMTGY	ATDALMTGF
1443-1451	NS3	A2	9	GFTGDFDSV	GFTGDFDSV
1492-1501	NS3	B27	10	GRGKPGIYRF	GRGRRGIIYRF
1531-1539	NS3	B35	9	TPAETTVRL	TPAETSVRL
1581-1589	NS3	A26	9	DNFPYLVAY	DNFPYLVAY
1581-1589	NS3	B18	9	DNFPYLVAY	DNFPYLVAY
1585-1593	NS3	A2	9	YLVAYQATV	YLVAYQATV
1596-1604	NS3	B58	9	RAQAPPPSW	RAQAPPPSW
1611-1618	NS3	B8	8	LIRLKPTL	LIRLKPTL
1627-1635	NS3	B13	9	RLGAVQNEV	RLGAVQNEV
1635-1643	NS3	A3	9	VTLTHPTIK	VTLTHPVTK
1636-1643	NS3	A11	8	TLTHPTIK	TLTHPVTK
1654-1657	NS3	A26	4	EVVTSTWVL	EVVTSTWVL
1658-1662	NS4A	A26	5	EVVTSTWVL	EVVTSTWVL
1661-1669	NS4A	A2	9	VLVGGVLAA	VLVGGVLAA
1666-1675	NS4A	A2	10	VLAALAAYCL	VLAALAAYCL
1695-1702	NS4A	B35	8	IPDREVLY	VPDREVLY
1744-1754	NS4B	A25	11	EVITPAVQTNW	EAAAPVVESKW
1745-1754	NS4B	A24	10	VIAPAVQTNW	AAAPVVESKW
1758-1766	NS4B	A25	9	ETFWAKHMW	EAFWAKHMW
1764-1772	NS4B	A2	9	HMWNFITGI	HMWNFISGI
1789-1797	NS4B	A2	9	SLMAFTASI	SLMAFTASI
1801-1809	NS4B	B57	9	LTTSQTLLF	LTTQHTLLF
1807-1816	NS4B	A2	10	LLFNILGGWV	LLFNILGGWV
1851-1859	NS4B	A2	9	ILAGYGAGV	ILAGYGAGV
1858-1867	NS4B	A3	10	GVAGALVAFK	GVAGALVAFK
1871-1879	NS4B	B40	9	GEMPSTEDL	GEMPSTEDL
1915-1923	NS4B	A2	9	WMNRLIAFA	WMNRLIAFA
1941-1948	NS4B	B38	8	AARVTAIL	AARVTQIL

1966-1972	NS4B	B37	7	SECCTPCSGSW	EDCSTPCSGSW
1968-1972	NS4B	B58	5	CTTPCSGSW	CSTPCSGSW
1973-1976	NS5A	B37	4	SECCTPCSGSW	EDCSTPCSGSW
1973-1976	NS5A	B58	4	CTTPCSGSW	CSTPCSGSW
1987-1995	NS5A	A2	9	VLTDFTKWL	VLTDFTKWL
2000-2008	NS5A	B35	9	LPKLPGVPF	LPRLPGVPF
2140-2149	NS5A	A2	10	LLREEVSFRV	LLREEVTFQV
2163-2171	NS5A	B35	9	EPEPDVAVL	EPEPDVATL
2173-2181	NS5A	A24	9	SMLTDPSHI	SMLTDPSHI
2184-2192	NS5A	A66	9	EAAGRRLAR	EAAKRRLAR
2218-2226	NS5A	B38	9	NHDSPDAEL	RHDSPDADL
2221-2231	NS5A	A2	11	SPDAELIEANL	SPDADLIEANL
2225-2233	NS5A	A25	9	ELIEANLLW	DLIEANLLW
2252-2260	NS5A	A2	9	ILDSFDPLV	ILDSFDPLR
2266-2275	NS5A	B40	10	REISVPAEIL	REISVPAEIL
2280-2288	NS5A	A24	9	KFPPALPIW	NFPRAMPIW
2336-2344	NS5A	B40	9	TESTLSTAL	TESTVSSAL
2415-2419	NS5A	A26	5	DVVCCSMSY	DVVCCSMSY
2420-2423	NS5B	A26	4	DVVCCSMSY	DVVCCSMSY
2422-2430	NS5B	A24	9	SYTWTGALI	SYTWTGALI
2449-2457	NS5B	B15	9	LLRHHNMVY	LLRHHNMVY
2466-2474	NS5B	B15	9	SQRQKKVTF	SQRQKKVTF
2509-2517	NS5B	A3	9	SLTPPHSAK	KLTPPHSAK
2567-2576	NS5B	B55	10	QPEKGGRKPA	QPEKGGRKPA
2577-2586	NS5B	A2	10	RLIVFPDLGV	RLIVFPDLGV
2587-2595	NS5B	A3	9	RVCEKMALY	RVCEKMALY
2593-2601	NS5B	A2	9	ALYDVVTKL	ALYDVVSTL
2628-2636	NS5B	B57	9	KSKKTPMGF	SSKKNPMGF
2726-2734	NS5B	A2	9	GLQDCTMLV	KLQDCTMLV
2793-2801	NS5B	A3	9	HDGAGKRKY	HDASGKRKY
2793-2803	NS5B	B38	11	HDGAGKRKYLL	HDASGKRKYLL
2818-2827	NS5B	A25	10	TARHTPVNSW	TARHTPVNSW
2819-2827	NS5B	B27	9	ARHTPVNSW	ARHTPVNSW
2835-2844	NS5B	B7	10	APTLWARMVL	APTLWARMVL
2840-2848	NS5B	B27	9	ARMILMTHF	ARMVLMTHF

Unterschiede zwischen GT 1b- und Anti-D-Sequenzen sind rot markiert. Publierte CD8-Epitope sind aus der öffentlichen Datenbank entnommen (<http://tools.immuneepitope.org>)

Die Häufigkeit der Mutationen in Anwesenheit eines spezifischen HLA-Allels wurde mit Hilfe des *fisher's exact* Tests ermittelt (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/index.html>). In Kooperation mit Prof. Hoffmann wurde ein automatisierter Algorithmus entwickelt (Bioinformatik, Zentrum für medizinische Biotechnologie, Universität Duisburg-Essen), der auf die gesamte Region der Nicht-Strukturproteine NS3 bis NS5B angewendet wurde. Dabei wurden Mutationen (X) an einer Aminosäureposition in Anwesenheit eines HLA-Allels (Y) und in Abwesenheit eines HLA-Allels (nicht-Y) gezählt und die statistische Signifikanz ermittelt ($p\text{-Wert} < 0,05$).

HLA-Allel	Anwesenheit	Abwesenheit
wt	nicht-X und Y	nicht-X und nicht-Y
Mutation	X und Y	X und nicht-Y

Abbildung 2.4: Kontingenztabelle

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss von HLA-Klasse I-assoziiertem Immundruck auf die Evolution von HCV in der Anti-D Kohorte

3.1.1 Phylogenetische Analyse der HCV-Sequenzen aus der Anti-D Kohorte

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass das Hepatitis C Virus durch Selektion von „Escape“-Mutationen dem CD8⁺ T-Zell-Immundruck ausweicht (Timm et al. 2004; Tester et al. 2005; Kuntzen et al. 2007). Studien von akuten und chronischen HCV-Infektionen bestätigen, dass in 50 % der CD8-Zielepitope „Escape“-Mutationen auftreten (Cox et al. 2005a; Neumann-Haefelin et al. 2008). Wie jedoch die Auswirkungen und die Abhängigkeit der Virusevolution von der HLA-Klasse I-Ausstattung innerhalb einer Population sind, ist bisher noch unklar. Um die Anpassung des Hepatitis C Virus zu untersuchen, wurde Patientenmaterial einer großen Ostdeutschen Kohorte verwendet. Dabei wurden 1977/78 über 2800 Frauen durch kontaminierte Immunglobuline für die Rhesus-Prophylaxe infiziert (Wiese et al. 2005).

Für die Analyse der Sequenzen stehen Serumproben der Patienten 30 Jahre nach Ausbruch der HCV-Infektion zur Verfügung. Von diesen wurde die genomische Region des Hepatitis C Virus NS3 bis NS5b (Codonregion 1027 – 2877) von 78 Patienten der Anti-D Kohorte amplifiziert und sequenziert (Referenznummer HQ908282-HQ908359). Die Sequenzen dieser Region wurden anschließend mit Sequenzen aus der öffentlichen HCV-Sequenzdatenbank in Los Alamos verglichen (<http://hcv.lanl.gov/>) (Kuiken et al. 2008). Die Ausrichtung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Se-AL v2.0a11 Carbon und mit Hilfe der Internetplattform ATGC (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) wurde ein phylogenetischer Baum mittels der „Maximum Likelihood“ (ML) Methode konstruiert (Guindon et al. 2010). Die Abbildung 3.1 zeigt den phylogenetischen Baum der HCV-Sequenzen in Radialform. Die Sequenzen der Anti-D Kohorte trennen sich eindeutig von den Referenzsequenzen der HCV-Datenbank. Interessanterweise erkennt man unterschiedliche Gruppierungen auch innerhalb der Anti-D Sequenzen. Dabei zeigten sich drei verschiedene phylogenetische Gruppen, die im Folgenden als Gruppe I (rot), II (blau) und III (grün) bezeichnet werden. Eine *Bootstrap*-Analyse wurde auf Grundlage von

100 zufälligen Replikaten des Datensatzes durchgeführt. Die hierbei ermittelten soliden Ergebnisse unterstreichen die Reproduzierbarkeit der Anordnung der phylogenetischen Gruppen und belegen damit die Validität des Baums.

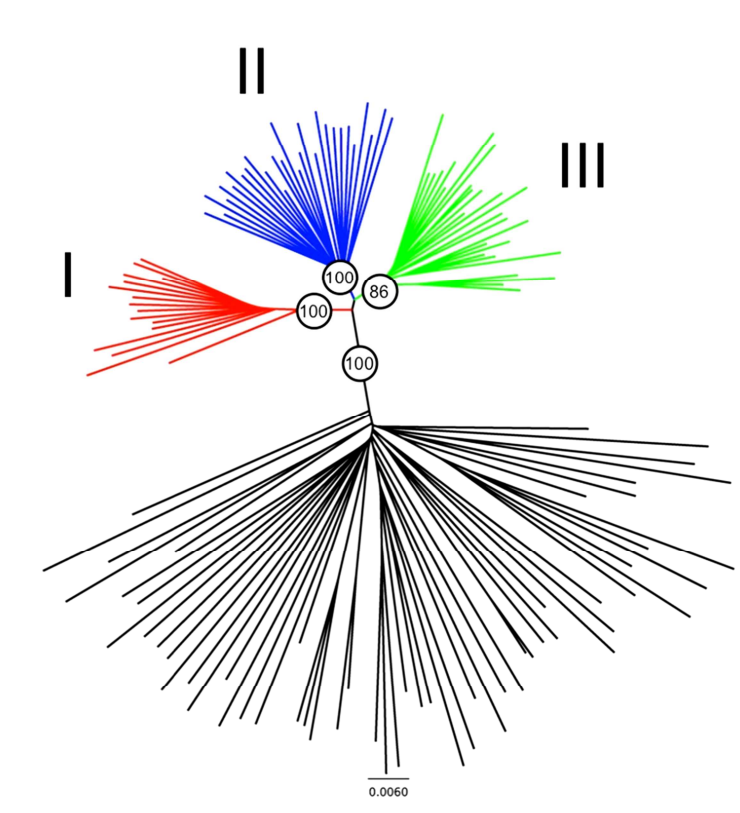


Abbildung 3.1: Phylogenetische Analyse der HCV-Sequenzen der NS3 bis NS5B-Region. Phylogenetischer Baum nach der ML-Methode mit HCV-Sequenzen der NS3 bis NS5B-Region (Codon 1027-2877) von Patienten der Anti-D Kohorte. HCV-Sequenzen aus der HCV-Sequenz-Datenbank (<http://hcv.lanl.gov/>) dienten als Vergleich. Die Sequenzen der Anti-D Kohorte teilen sich in drei verschiedene Gruppen auf (I, II, III), die farblich in rot, blau und grün markiert sind. Die ermittelten *Bootstrap*-Werte der einzelnen phylogenetischen Äste sind auf den dazugehörigen Knoten dargestellt.

Durch die Ausbildung der drei Gruppen innerhalb der Virussequenzen der Anti-D Kohorte stellt sich die Frage, ob diese sich im Laufe der Virusevolution entwickelt haben oder ob die Gruppen aus drei HCV-Varianten entstanden sind, die bereits beim Ausbruch im Jahre 1977/78 in der Infektionsquelle existierten. Aus diesem Grund wurden aus dem HCV-Genom die Regionen NS3 und NS5B aus zwei verschiedenen Chargen (#08 und #12) der HCV-kontaminierten Immunglobuline amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden kloniert und einzelne Klone sequenziert.

Die Abbildung 3.2 zeigt einen phylogenetischen Baum der klonalen Sequenzen aus der Infektionsquelle zusammen mit Patientenisolaten aus der Anti-D Kohorte in der

[illegible]

Abbildung 3.2: Phylogenetische Analyse von HCV-Sequenzen der NS3-Region. Phylogenetischer Baum nach der ML-Methode mit HCV-Sequenzen der NS3-Region (Codon 1027-1364) von Patienten der Anti-D Kohorte. Die Gruppen sind rot (I), blau (II) und grün (III) markiert. Die klonalen Sequenzen der Infektionsquelle (Immunglobulincharge 08 und Immunglobulincharge 12) sind orange markiert. Die ermittelten *Bootstrap*-Werte der einzelnen phylogenetischen Äste sind auf den dazugehörigen Knoten dargestellt.

Für die Analyse NS5B-Region 2368–2877 wurden die HCV-Sequenzen der Anti-D Patienten mit den klonalen Sequenzen der Infektionsquelle aus der Charge #12 miteinander verglichen. Es war nicht möglich, die NS5B-Region der Infektionsquelle aus der Charge #08 zu amplifizieren. Wie zu erwarten, zeigt auch hier die Abbildung 3.3 die Aufteilung der Anti-D Patienten in drei Gruppen, ausgehend von drei Knoten für die NS5B-Region. Dabei ist zu erkennen, dass die klonalen Sequenzen der Infektionsquelle nur in Gruppe II und III vorkommen. Auch nach erneuter Amplifizierung der NS5B-Region in der Infektionsquelle konnten keine repräsentativen Sequenzen der Gruppe I nachgewiesen werden.

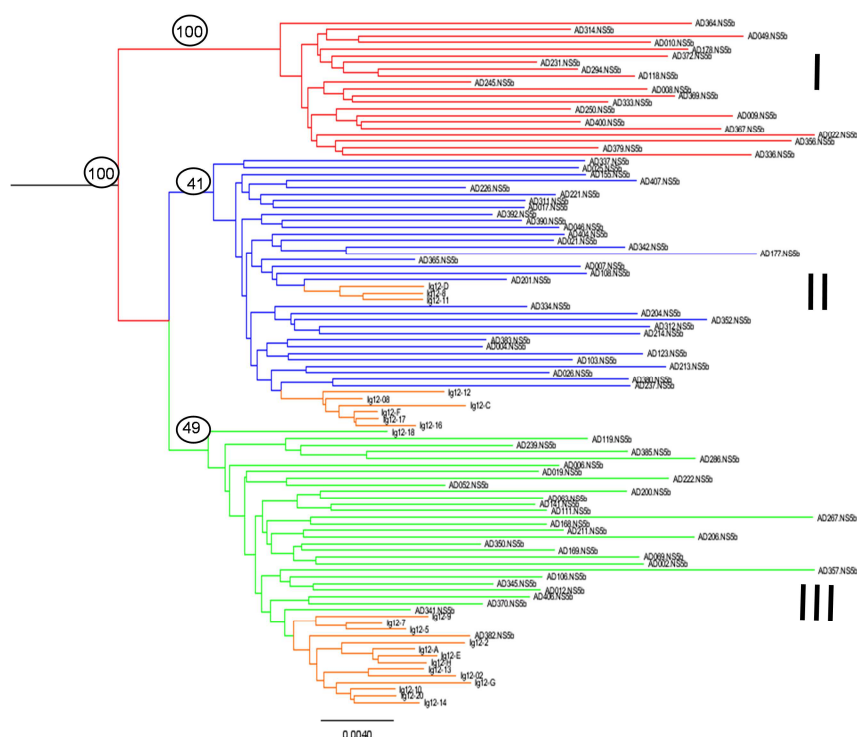


Abbildung 3.3: Phylogenetische Analysen der HCV-Sequenzen der NS5B-Region. Phylogenetischer Baum nach der ML-Methode mit HCV-Sequenzen der NS5B-Region (Codon 2368-2877) von Patienten der Anti-D Kohorte. Die Gruppen sind rot (I), blau (II) und grün (III) markiert. Die klonalen Sequenzen der Infektionsquelle Immunglobulincharge 12 sind orange markiert. Die ermittelten *Bootstrap*-Ergebnisse der einzelnen phylogenetischen Äste sind auf den dazugehörigen Knoten dargestellt.

Zusammengefasst konnte mit Hilfe der phylogenetischen Analyse bewiesen werden, dass die HCV-Sequenzen der Anti-D Kohorte eine separate Gruppe zu vergleichbaren HCV-Sequenzen bilden. Ferner ist die Anti-D Kohorte in drei Gruppen aufgeteilt, welche aus drei HCV-Varianten in der Infektionsquelle entstanden sind.

3.1.2 Evolutionäre Entwicklung der Anti-DSequenzen im Vergleich zur HCV-Konsensussequenz des Genotyps 1b

In vorherigen Abschnitten wurde anhand der phylogenetischen Analyse dargelegt, dass die HCV-Sequenzen der Anti-D Kohorte in drei Gruppen unterteilt sind. Um die evolutionäre Entwicklung im Laufe der letzten 30 Jahre zu untersuchen, wurde die NS3Region der Sequenzen aus den Anti-D Patienten, der Infektionsquelle und der Konsensussequenz aller Genotyp 1b Sequenzen (verfügbar unter <http://hcv.lanl.gov/>) miteinander verglichen. Die HCV-Sequenzen der Anti-D Patienten und die klonalen Sequenzen der Infektionsquelle wurden den jeweiligen Gruppen zugeordnet.

Tabelle 3.1: Vergleich der Konsensussequenzen der Infektionsquelle, der Anti-D-Patienten und der allgemeinen GT 1b Konsensussequenz.

Position	GT 1b	Gruppe I		Gruppe II		Gruppe III	
		Infektions- quelle	Patienten	Infektions- quelle	Patienten	Infektions- quelle	Patienten
1082	Y	Y(3/6)	Y(20/20)	F(14/15)	F(16/26)	F(18/18)	F(27/32)
1112	Q	P(6/6)	P(20/20)	P(15/15)	P(23/26)	P(18/18)	P(29/32)
1115	P	S(6/6)	S(16/20)	P(13/15)	P(24/26)	S(17/18)	S(22/32)
1134	T	S(6/6)	S(19/20)	S(15/15)	S(26/26)	S(18/18)	S(30/32)
1176	A	V(6/6)	V(20/20)	V(15/15)	V(26/26)	V(18/18)	V(32/32)
1205	M	T(6/6)	T(13/20)	T(15/15)	T(16/26)	T(18/18)	T(23/32)
1263	G	G(6/6)	G(20/20)	G(15/15)	G(26/26)	S(17/18)	S(32/32)
1277	N	N(5/6)	N(18/20)	N(14/15)	N(26/26)	S(17/18)	S(26/32)
1290	P	P(5/6)	P(17/20)	S(12/15)	S(22/26)	P(17/18)	P(30/32)
1325	T	S(6/6)	S(20/20)	S(15/15)	S(26/26)	S(18/18)	S(32/32)
1384	T	T(9/10)	T(14/20)	T(5/5)	T(19/26)	T(10/10)	A(22/32)
1386	K	K(8/10)	K(17/20)	K(4/5)	K(26/26)	R(9/10)	K(16/32)
1406	K	Q(10/10)	Q(13/20)	Q(5/5)	Q(23/26)	Q(10/10)	Q(31/32)
1412	L	I(10/10)	I(17/20)	I(5/5)	I(21/26)	I(10/10)	I(16/32)
1496	R	R(10/10)	R(20/20)	R(5/5)	R(26/26)	K(10/10)	K(28/32)
1641	I	V(7/10)	V(14/20)	V(3/3)	V(20/26)	V(9/9)	(V18/32)

Die Aminosäureposition wurde aus den Referenzen der öffentlichen Datenbank (<http://hcv.lanl.gov/>) entnommen sowie die GT 1b Konsensussequenz. Die Infektionsquelle und die Patienten-Sequenzen der Anti-D Kohorte wurden den jeweiligen Gruppen zugeordnet. Die fett markierten Ziffern weisen auf einen Unterschied zwischen der Infektionsquelle und den Patienten hin.

In Tabelle 3.1 wurden 16 Positionen in NS3 aufgelistet, an denen sich die allgemeine Genotyp 1b Konsensussequenz, die Konsensussequenz aus der Infektionsquelle oder die Konsensussequenz aus den Anti-D Patienten unterscheidet. Zusätzlich wurde angegeben, wie häufig die auftretenden Aminosäuren in den einzelnen Sequenzen der Infektionsquelle bzw. in den Patienten der Anti-D Kohorte vorkommt. Interessanterweise sind die Varianten, die in der Infektionsquelle der Anti-D Kohorte im Vergleich zu der GT 1b Konsensussequenz auftreten, sehr stabil. Zum Beispiel weist die Konsensussequenz von GT 1b an Position 1325 die Aminosäure Threonin (T) auf. In der Infektionsquelle hingegen ist an dieser Position in allen klonalen Sequenzen der drei Gruppen Serin (S). Verglichen mit anderen HCV-Sequenzen aus der öffentlichen Datenbank ist Serin an dieser Position sehr selten (Kuiken et al. 2008). Trotzdem ist es in keiner der Virussequenzen aus den Patienten in allen drei Gruppen zu einer Reversion von Serin zu Threonin innerhalb der 30 Jahre gekommen. Daher kann angenommen werden, dass Serin an der Position 1325 ein fester Bestandteil der Anti-D-Sequenzen ist. Position 1112 ist ein weiteres Beispiel für eine weitgehend stabile Aminosäure im Laufe der letzten 30 Jahre der Anti-D Kohorte, obwohl sich auch hier die allgemeine Genotyp 1b Konsensussequenz unterscheidet. Sowohl die klonalen Sequenzen der Infektionsquelle als auch die Patienten-Sequenzen (mit Ausnahme von insgesamt sechs Patienten) in allen drei Gruppen selektieren die Aminosäure Prolin (P). In der GT 1b Konsensussequenz kommt an dieser Position ein Glutamin (Q) vor. Auch innerhalb einzelner Gruppen waren viele der Sequenzunterschiede über die Zeit weitgehend unverändert. Während z.B. auf der Position 1263 in der Konsensussequenz von GT 1b Glycin (G) vorkommt, wurde in der Infektionsquelle von Gruppe II in 17 von 18 klonalen Sequenzen sowie in allen Patienten-Sequenzen Serin selektiert. Zu den Ausnahmen gehören die Positionen 1384 und 1386. In den klonalen Sequenzen der Infektionsquelle in Gruppen II und in der allgemeinen Konsensussequenz von GT 1b ist Threonin (T) die am häufigsten vorkommende Aminosäure auf Position 1384. Hingegen wurde in den Patienten-Sequenzen von Gruppe II nach 30 Jahren eine Selektion hin zu Alanin (A) beobachtet. In Position 1386 kommt in der Infektionsquelle von Gruppe II am häufigsten die Aminosäure Arginin (R) vor. Allerdings ist sowohl in der GT 1b Konsensussequenz als auch in den Patienten-Sequenzen Lysin (K) die am häufigsten vorkommende Aminosäure.

In dem Nicht-Strukturprotein NS3 konnte in den klonalen Sequenzen der Infektionsquelle und in den Patientensequenzen der Anti-D Kohorte nur eine geringe Selektion zur GT 1b Konsensussequenz beobachtet werden. Mit zwei Ausnahmen (Position 1384 und 1386 in Gruppen II) wurde gezeigt, dass die gruppenspezifischen Konsensussequenzen der Infektionsquelle und die Konsensussequenzen der Anti-D-Patienten nach 30 Jahren nahezu identisch sind. Dieses Ergebnis war wichtig, da aufgrund der technischen Schwierigkeiten bei der PCR aus der 30 Jahre alten Infektionsquelle nicht alle genomischen Bereiche für die Nicht-Strukturproteine erfolgreich amplifiziert werden konnten. Daher wurde für die folgenden Analysen der gesamten genomischen Region der Nicht-Strukturproteine statt der Konsensussequenz aus der Infektionsquelle eine gruppenspezifische Konsensussequenz aus den Patientenisolaten verwendet. Aufbauend auf die exemplarischen Ergebnisse für das NS3-Gen scheint dieser Schritt zulässig, da die Analyse der Virusevolution dadurch nur minimal beeinflusst wird.

3.1.3 Die Virusevolution in den einzelnen Nicht-Strukturproteinen

Die Evolution der Gene für die Nicht-Strukturproteine innerhalb der letzten 30 Jahre wurde genauer analysiert, indem die Zahl der Mutationen in den verschiedenen Genabschnitten als Unterschiede zwischen den einzelnen Virussequenzen der Patienten nach 30 Jahren und der gruppenspezifischen Konsensussequenz der Patienten isolate bestimmt wurde. Dabei wurde zwischen synonymen (stille) Mutationen und nicht-synonymen Mutationen (kodiert eine andere Aminosäure als ursprünglich/ Substitution der Aminosäure) unterschieden. Betrachtet man zunächst die Häufigkeit der synonymen Mutationen, so erkennt man eine einheitliche Verteilung in den individuellen Genen (Abbildung 3.4). Die Häufigkeit der nicht-synonymen Mutationen zeigte jedoch Unterschiede in den individuellen Genen. Im Vergleich zu den übrigen Genen kamen die nicht-synonymen Mutationen häufiger in NS5A vor. Aufbauend auf diese Ergebnisse stellt sich die Frage, welchen Einfluss der Selektionsdruck der adaptiven Immunantwort auf die virale Evolution der Nicht-Strukturproteine hat.

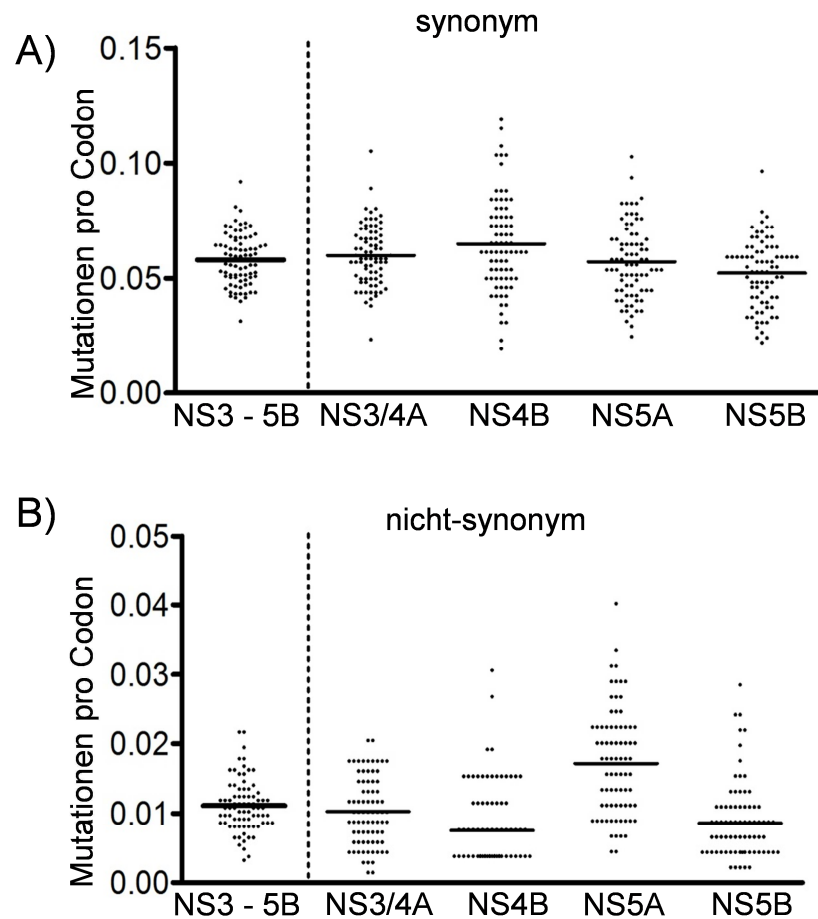


Abbildung 3.4: Häufigkeit der synonymen und nicht-synonymen Mutationen in den einzelnen Nicht-Strukturproteinen. Analyse der Mutationshäufigkeiten in der kompletten Region NS3 bis NS5B. A) Die Häufigkeit der synonymen Mutationen pro Codon in den einzelnen Nicht-Strukturproteinen NS3/4A, NS4B, NS5A und NS5B. B) Die Häufigkeit der nicht-synonymen Mutationen pro Codon in den einzelnen Nicht-Strukturproteinen NS3/4A, NS4B, NS5A und NS5B.

3.1.4 Die Verteilung der HLA-Allele in der Anti-D Kohorte

Um den CD8-Selektionsdruck auf die virale Evolution und die Bedeutung von Mutationen in Zielepitopen von CD8⁺ T-Zellen besser zu charakterisieren, muss die HLA-Restriktion der CD8-Epitope mit einbezogen werden. Daher wurden von allen verfügbaren Proben aus der Anti-D Kohorte eine Genotypisierung des HLA-A- und HLA-B-Genlokus durchgeführt. In der Anti-D-Kohorte ist ein breites Spektrum an individuellen HLA-Allelen vertreten, die mit Daten aus Deutschland verglichen wurden (www.allelefreqencies.net). Die Häufigkeiten der HLA-Allele sind in beiden Kohorten ähnlich verteilt (Abbildung 3.5). Daher scheint die Anti-D Kohorte bezüglich der HLA-Ausstattung repräsentativ für die deutsche Bevölkerung zu sein.

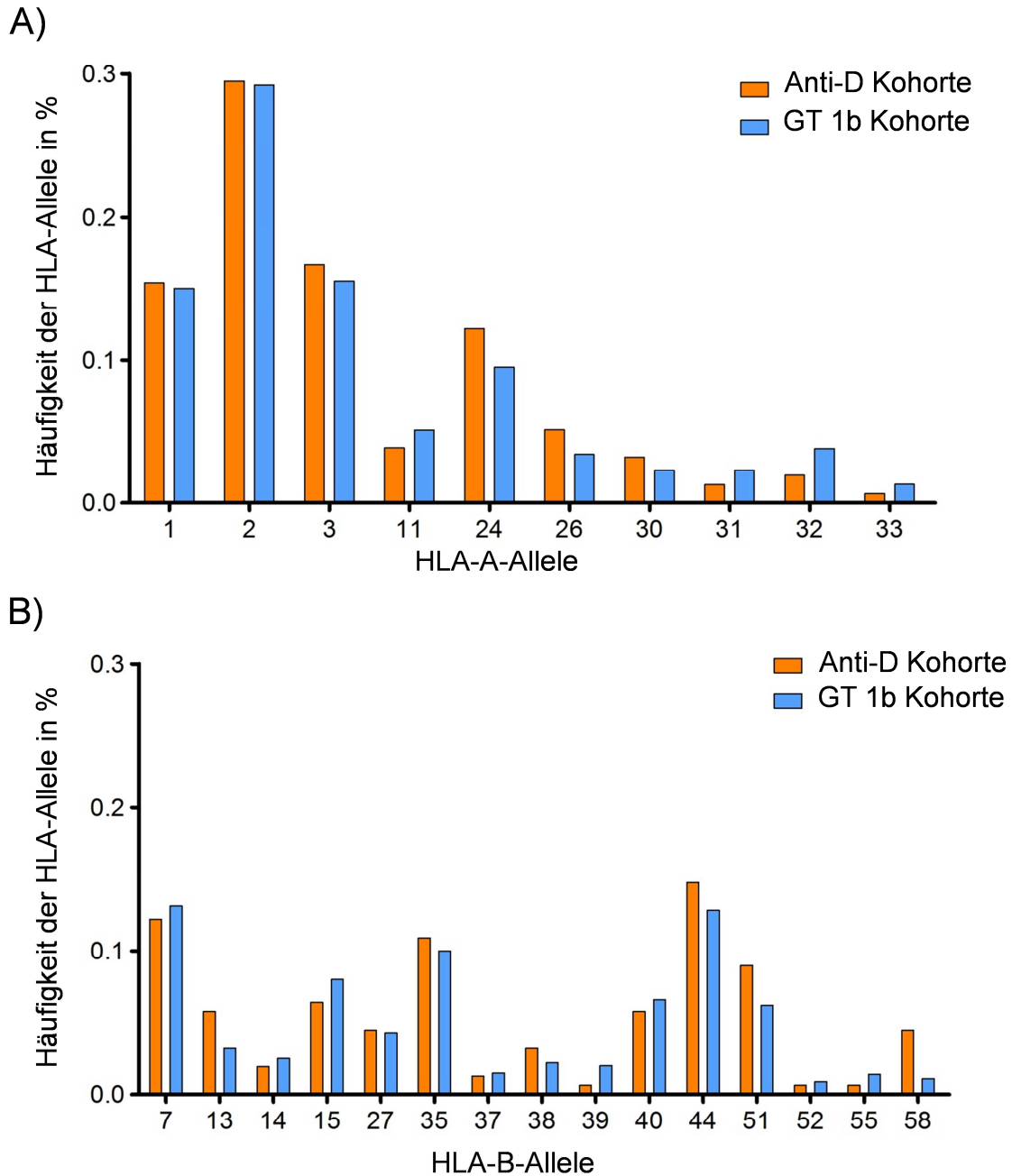


Abbildung 3.5: Verteilung der HLA-Allele in der Anti-D Kohorte und einer GT 1b Kohorte. Die Häufigkeit der HLA-Allele von 78 Patienten der Anti-D Kohorte wurden mit 174 Patienten einer GT 1b Kohorte (Essen-Deutschland) verglichen (www.allelefreqencies.net). A) Vergleich der auftretenden HLA-A-Allele aus der Anti-D Kohorte mit einer GT 1b Kohorte (Essen-Deutschland). B) Vergleich der auftretenden HLA-B-Allele aus der Anti-D Kohorte mit einer GT 1b Kohorte (Essen-Deutschland).

3.1.5 Die Virusevolution in individuellen CD8-Epitopen

Die CD8-Epitope, die auf der Oberfläche eines infizierten Hepatozyten präsentiert werden können, werden durch die individuellen HLA-Allele des Wirtsgenoms bestimmt. Im Laufe der viralen Evolution können durch den Immundruck Mutationen

in den HLA-restringierten CD8-Epitopen entstehen. In Abbildung 3.6 sind zur Verdeutlichung beispielhaft die Virussequenzen in zwei bekannten HLA-spezifischen CD8-Epitopen dargestellt.

		B*35 1359 - 1367										A*02 1406 - 1415							
		HPNIEEVAL										QLSGLGINAV							
B*35 +	AD003	S	A*02 +	AD001	.	.	C	.	V	.	.	.
	AD008		AD072	R	.	M	I
	AD024		AD002
	AD026	S		AD004	V	.	.
	AD052		AD007	.	L	.	.	.	V	.	.
	AD072		AD013	K	L	.	.
	AD111	H		AD042	.	.	MA
	AD178	S		AD178	H	.	L	N
	AD336	S		AD059	.	.	L
	AD119		AD063	K	V	.	.
	AD141		AD102	L	.	.
	AD169		AD103
	AD211		AD106	R	V	.	I
	AD239		AD123	.	V	.	.	.	L	.	.
	AD312		AD168	V	.	.
	AD332		AD169	I
	AD333		AD200	.	.	A	.	.	V	.	.
	AD345		AD201	H	V	.	.
AD370	AD214	.	.	A	.	.	L	.	.		
AD375	S	AD216	L	.	.		
AD382	AD231	K	I		
B*35 -	AD001	A*02 -	AD247	.	.	T	.	L	.	.	
	AD002		AD286	I
	AD004		AD294	I
	AD006		AD333	.	.	S	
	AD007		AD337	L	.	.
	AD009		AD341	.	.	M	
	AD010		AD350	V	.	.
	AD012		AD352	L	.	.
	AD013		AD365	.	.	A	S	.	.	.	
	AD017		AD407	.	.	V	.	.	V	.	.
	AD019		AD003
	AD021		AD006
	AD022		AD009	H
	AD025		AD012
	AD040		AD017
	AD042		AD024
	AD046		AD025
	AD048		AD046
	AD049		AD048
	AD054		AD054
	AD058		AD058
	AD062		AD062
	AD063		AD064
	AD064		AD069
	AD069		AD070
	AD070		AD082

Abbildung 3.6: Schematische Darstellung von HLA-Klasse I-spezifischen CD8-Epitopen. Auf der linken Seite das HLA-B*35-Epitop HPNIEEVAL₁₃₅₉₋₁₃₆₇. Die Anti-D-Sequenzen wurden in HLA-B*35-positive Patienten und HLA-B*35-negative Patienten aufgeteilt. Das rote Rechteck umrandet die Ankerregion der Bindungsfurche. Auf der rechten Seite das HLA-A*02-Epitop QLSGLGINAV₁₄₀₆₋₁₄₁₅. Die Anti-D-Sequenzen wurden in HLA-A*02-positive Patienten und HLA-A*02-negative Patienten aufgeteilt.

Für das HLA-B35-spezifische Epitop (links) wurden die Virussequenzen in die von HLA-B*35-positiven (oben) und die von HLA-B*35-negativen Patienten (unten) aufgeteilt. Dabei ist zu erkennen, dass Mutationen nur bei den HLA-B*35-positiven Patienten auftreten. Alle Mutationen werden reproduzierbar an der zweiten Position des Epitops selektiert. Da es sich hierbei um die Ankerposition des Peptids für das HLA-B*35-Molekül handelt, ist davon auszugehen, dass die Mutation die Interaktion mit dem HLA-Molekül behindert. In einem zweiten Beispiel wurde ein bekanntes HLA-A*02-restringiertes Epitop untersucht (rechts). In diesem zeigt sich in den Virussequenzen von HLA-A*02-positiven Patienten (oben) eine eher willkürliche Verteilung der Mutationen über nahezu das gesamte Epitop. Die wichtige Ankerposition 2 ist hier im Gegensatz zum HLA-B*35-restringierten Epitop komplett ausgespart von Mutationen. Möglicherweise werden Mutationen aufgrund von funktionellen Zwängen an dieser Stelle nicht toleriert. Die Mutationen in diesem Epitop behindern wahrscheinlich eher die Interaktion zwischen HLA-Klasse I/Peptid-Komplex mit dem T-Zell-Rezeptor einer spezifischen CD8⁺ T-Zelle. In beiden Fällen ist es unter dem Druck der CD8⁺ T-Zellantwort zu einer Selektion von Mutationen gekommen, sodass die Virusevolution durch die Immunantwort beeinflusst wurde.

3.1.6 Die Evolutionsrate von synonymen und nicht-synonymen Mutationen innerhalb bekannter CD8-Epitope

Aufbauend auf den beispielhaft im vorangegangenen Abschnitt dargestellten Zusammenhang zwischen HLA-Klasse I-assoziiertem Selektionsdruck und der Evolution von HCV wurde die Bedeutung der Immunantwort für die Virusevolution insgesamt untersucht. Dazu wurde die Frage gestellt, ob nicht-synonyme Mutationen signifikant häufiger in bekannten CD8-Epitopen sind. Basierend auf 84 beschriebenen CD8-Epitopen und des HLA-Klasse I-Genotyps wurde die CD8-Epitopregion definiert. Dabei ist zu beachten, dass sich nicht bei jedem Patienten 84 verschiedene CD8-Epitope erkennen lassen, sondern nur die zu den individuellen HLA-Allelen passenden. Abbildung 3.7 zeigt schematisch die Verteilung der CD8-Epitope im Nicht-Strukturprotein NS3. Hier liegen insgesamt 42 publizierte CD8-Epitope, die über das gesamte Protein verteilt sind.

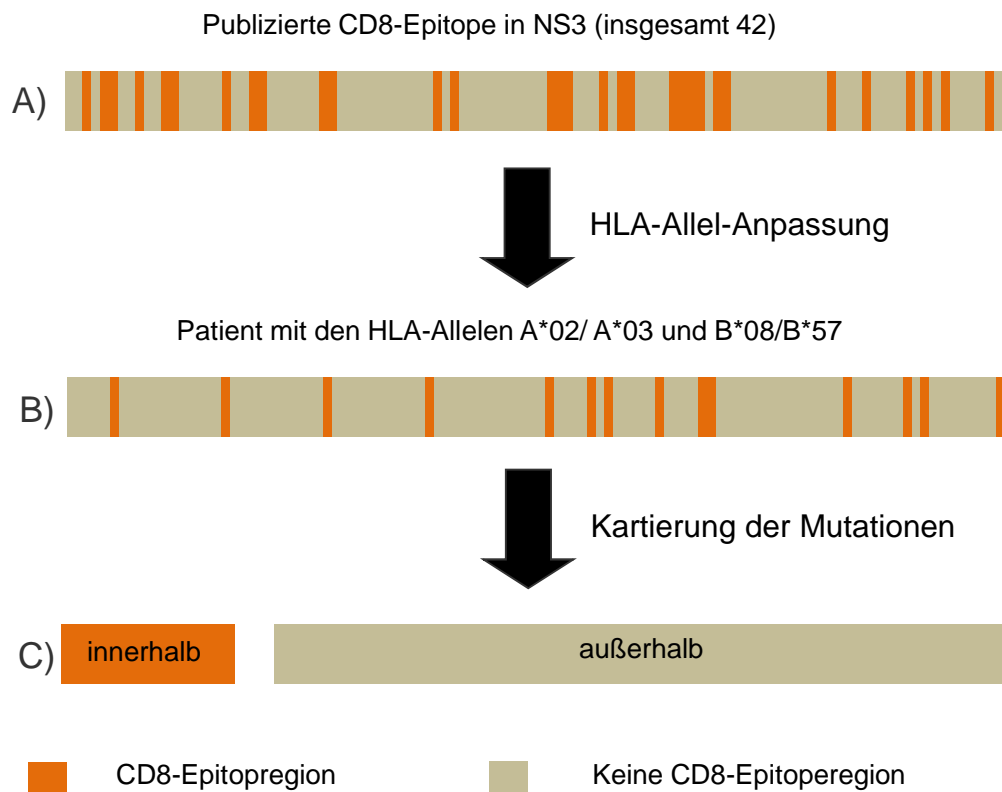


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Verteilung der CD8-Epitope im Nicht-Strukturprotein NS3. A) Von den 84 verwendeten CD8-Epitopen kommen 42 CD8-Epitope im NS3-Protein vor. Die Epitopregion ist dargestellt in orange. B) Anpassung der spezifischen CD8-Epitope bei einem Patient mit den HLA-Allelen A*02/*03 B*08/*57. C) Kartierung der Mutationen innerhalb und außerhalb der CD8-Epitope.

Erst nach Abgleich der tatsächlich vorhandenen individuellen HLA-Allele konnte die Epitopregion exakt für jeden Patienten definiert werden, und die Mutationen entsprechend ihrer Lage in die Kategorien „innerhalb“ und „außerhalb“ von CD8-Epitopen eingeteilt werden. Die Häufigkeit von synonymen und nicht-synonymen Mutationen innerhalb und außerhalb HCV-spezifischer CD8-Epitope ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

Die Häufigkeit von synonymen Mutationen in der gesamten Codonregion NS3 bis NS5B ist sowohl innerhalb der CD8-Epitope als auch außerhalb der CD8-Epitope gleich (Abbildung 3.8 A). Im Gegensatz dazu sind die nicht-synonymen Mutationen häufiger in den HCV-spezifischen CD8-Epitopen als in der Region außerhalb der CD8-Epitope ($p < 0,001$; Abbildung 3.8 B). Die Analyse der einzelnen Gene für die Nicht-Strukturproteine hat ergeben, dass die Rate der nicht-synonymen Mutationen vor allem in NS3/4A und NS5B innerhalb der Epitopregion erhöht ist (Abbildung 3.8

C & F). Für die Gene NS4B und NS5A (Abbildung 3.8 D & E) zeigten sich in der Häufigkeit der nicht-synonymen Mutationen keine signifikanten Unterschiede.

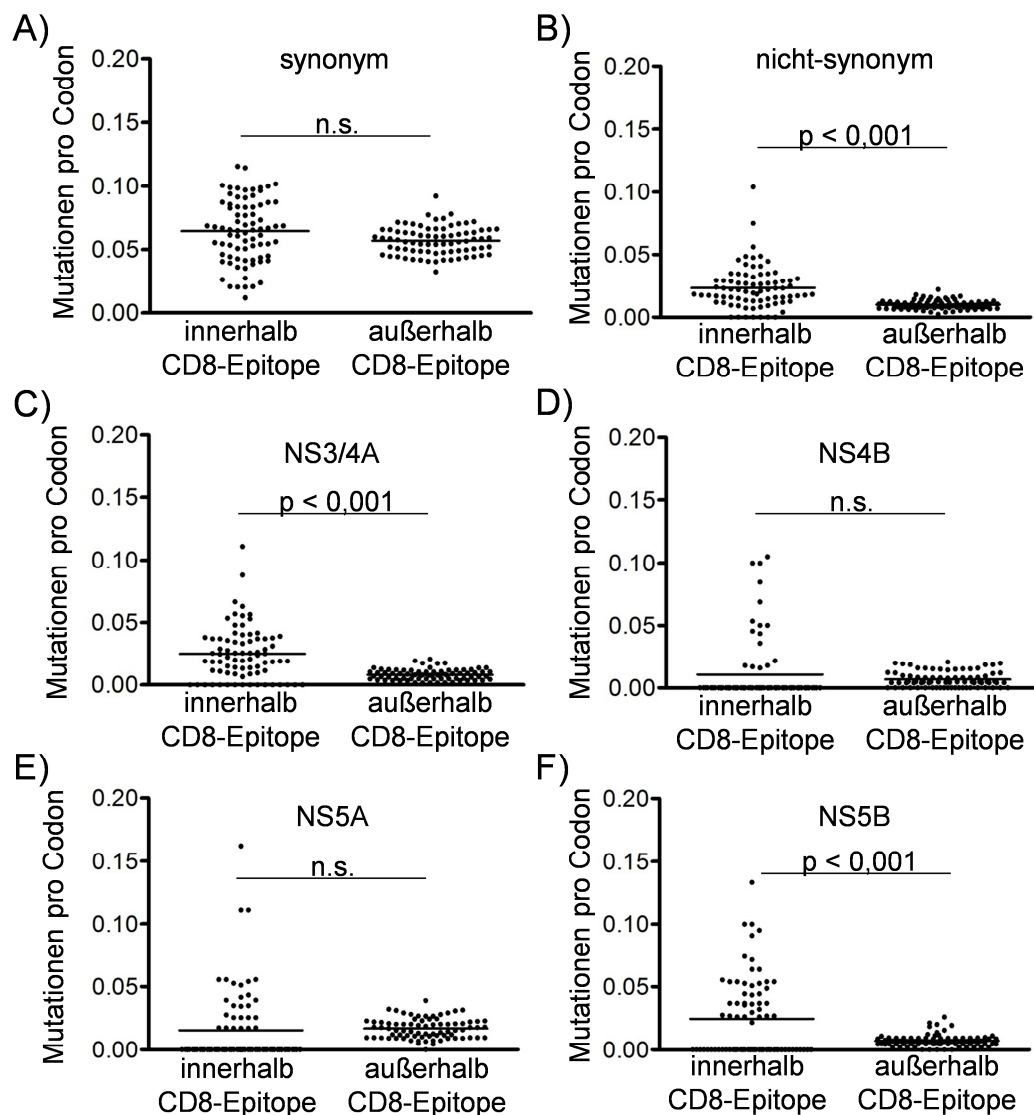


Abbildung 3.8: Mutationsrate innerhalb und außerhalb beschriebener HCV-spezifischer CD8-Epitope. Analyse der Mutationshäufigkeiten in der kompletten Codonregion NS3 bis NS5B. A) Die Häufigkeit der synonymen Mutationen. B) Die Häufigkeit der nicht-synonymen Mutationen. C-F) Die Häufigkeit der nicht-synonymen Mutationen pro Codon in den einzelnen Nicht-Strukturproteinen C) NS3/4A, D) NS4B, E) NS5A und F) NS5B. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der Varianzanalyse ANOVA (GraphPad Programm) und der Bonferroni-Korrektur durchgeführt. n.s. nicht signifikant.

3.1.7 Identifizierung neuer potentieller CD8-Epitope

3.1.7.1 Identifizierung von Epitop-Kandidaten aufgrund statistischer Analysen

Die Analyse der Evolutionsrate von nicht-synonymen Mutationen basiert auf bereits publizierten CD8-Epitopen. Selbstverständlich ist die Liste der bekannten Epitope nicht komplett und es erfordert weitere Studien um neue CD8-Epitope zu identifizieren (Neumann-Haefelin et al. 2008). Die Sequenzanalysen und die daraus resultierenden Ergebnisse, dass nicht-synonyme Mutationen häufiger innerhalb beschriebener CD8-Epitope vorkommen, zeigen, dass die Virusevolution des Hepatitis C Virus abhängig von HLA-Klasse I-Allelen ist. Darauf aufbauend stellt sich die Frage, ob durch eine Sequenzanalyse neue, unbekannte CD8-Epitope identifiziert werden können.

Mit Hilfe des *fisher's exact* Tests wurde die Häufigkeit einer Mutation an einer Aminosäureposition in Anwesenheit und Abwesenheit eines spezifischen HLA-Alleles ermittelt (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/index.html>). Um die Berechnung für jede Aminosäureposition der Nicht-Strukturproteine NS3 bis NS5B auszuführen, wurde in Kooperation mit Prof. Hoffmann ein automatisierter Algorithmus entwickelt (Bioinformatik, Zentrum für medizinische Biotechnologie, Universität Duisburg-Essen). Anschließend wurde die Region um den entsprechenden Polymorphismus mit Hilfe eines *MHC-I-binding-prediction*-Programms (http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_binding.html) auf mögliche MHC-Bindungsmotive für das entsprechende HLA-Allel überprüft. Die Tabelle 3.2 listet die Aminosäurepositionen auf, die mit einem spezifischen HLA-Allel assoziiert sind ($p < 0,01$).

Tabelle 3.2: Polymorphismen in Anwesenheit eines spezifischen HLA-Allels in bekannten und möglichen CD8-Epitopen.

Position	HLA-Allel	p-Wert	bekanntes Epitop	vorhergesagtes Epitop
1112	B07	0,000704738		WPAPSGARSL
1115	B07	0,000579489		WPAPSGARSL
1205	B13	0,008627195		-
1205	B15	0,007171262		k.v.
1282	B08	0,00613548		k.v.
1360	B35	0,000237043	HPNIEEVAL	k.v.
1374	B51	0,007548558	k.v.	
1384	B51	0,007548558		
1398	B08	0,000508851	HSKKKCDEL	
1409	B15	0,002916397	GLGINAVAYY	
1412	A02	2,1103E-05	QLSGLGINAV	
1415	B13	0,005224484		-
1587	B18	1,9021E-05		DNFPYLVAY
1606	B13	0,00103768		-
1633	B13	0,001532246		
1676	B27	0,003351958		k.v.
1679	A26	0,004897748		k.v.
1698	B18	0,004897748		DEMEECASH
1722	B35	0,001554271		LPYIEQGMQL
1729	A03	0,003304708		ALGLLQTATK
1745	A26	0,003827586		k.v.
1756	B07	0,004480846		VVESKWRAL
1762	B18	0,000260378		k.v.
1805	A26	0,003063305		FTASITSPL
1824	B18	0,001596546		k.v.
1851	B08	0,00613548		k.v.
1872	B15	0,002916397		GVAGALVAF
1872	B40	0,002916397		GEMPSTEDL
1873	B40	0,001054291		GEMPSTEDL
1875	A11	0,009666446		GVAGALVAFK
1875	B07	0,006836135		k.v.
1876	B40	0,002916397		GEMPSTEDL
1880	B40	0,001985471		-
1950	A23	0,004900837		k.v.
1950	B51	0,000736412		k.v.
1969	B07	0,006836135		k.v.
1989	A26	0,009143968		-
2009	B07	0,002517438		LPRLPGVPFF

2030	B40	0,007171262		k.v.
2036	A03	0,001943308		k.v.
2036	A26	0,009143968		k.v.
2055	B13	0,000359397		-
2086	B51	0,004341502		k.v.
2110	B08	0,004210119		k.v.
2118	B07	0,006836135		k.v.
2146	A23	0,002150611		k.v.
2146	B44	0,006180466		REEVTFQVGL
2166	B35	0,009135185	EPEPDVTVL	
2185	B18	0,005356475		k.v.
2187	B40	0,009011604		k.v.
2218	B40	0,00055994		k.v.
2266	B35	0,009143968		k.v.
2266	B40	0,009128188	REISVPAEI	
2268	B13	0,001295735		-
2271	B40	0,000130699	REISVPAEI	
2319	B08	0,009984511		k.v.
2321	B35	0,009143968		k.v.
2324	B15	0,003818804		k.v.
2336	B35	0,009143968		k.v.
2364	B51	0,007548558		k.v.
2365	B51	0,002420845		k.v.
2375	B44	0,002419964		k.v.
2385	B18	0,002919804		k.v.
2439	B15	0,001985471		k.v.
2452	B15	0,001985471		LLRHHNMVY
2453	B15	0,000311244		LLRHHNMVY
2455	B15	0,000311244		LLRHHNMVY
2462	A26	0,003827586		-.
2469	B13	0,000658807		k.v.
2469	B15	0,001267185		SQRQKKVTF
2481	B13	0,001610047		-
2482	B27	0,002612667		YRDVLKEMK
2484	A02	0,009492997		VLDDHYWDV
2517	A03	3,632E-06	KLTPPHSAK	
2600	B40	0,007171262	.	k.v.
2665	B51	0,007548558		LAPEARQAI
2667	B57	0,001532246		-.
2673	B13	0,000554542		k.v.
2681	B07	0,00039179		k.v.
2719	B07	0,009884204		k.v.

2728	B57	0,002916397		k.v.
2748	B35	0,009143968		k.v.
2754	B13	0,004803093		-
2757	B15	0,002916397		SLRVFTEAM
2796	A26	0,001532246		k.v.
2820	B27	0,000103883	ARHTPVNSWL	
2821	B18	0,001532246		WETARHTPV
2840	B27	1,2551E-05	ARMVLMTHF	
2843	B07	0,001554595		APTLWARMVL
2843	B13	0,006954066		-
2845	B27	0,000700904	ARMVLMTHF	
2860	B35	0,009143968		k.v.
2864	B15	0,003818804		k.v.
2864	B57	0,001596546		k.v.

Die Häufigkeit der Mutationen in Anwesenheit des jeweiligen HLA-Allels wurde für die gesamten Aminosäurepositionen der Region NS3 bis NS5B (Position 1027-2887) berechnet. Anschließend wurde mit Hilfe des *MHC-I-binding-prediction*-Programms mögliche und schon bekannte Epitope ermittelt. Polymorphismen in den Epitopen sind fett markiert. k.v. kein Epitop vorhergesagt. - Keine Bindungsdaten zu dem HLA-Allel vorhanden.

Durch die statistische Auswertung konnten eine Reihe von Mutationen gezeigt werden, die mit einem HLA-Allel-abhängigen Selektionsdruck assoziiert sind. Allerdings wurde als Grenzwert für diese Analyse ein p-Wert von 0,01 definiert. Dieser p-Wert wurde nicht korrigiert für multiple Vergleiche, sodass sicherlich falsch positive Ergebnisse in der Tabelle enthalten sind. Daher kann diese Ergebnisliste lediglich als Grundlage für weitere spezifische Analysen angesehen werden.

3.1.7.2 Bestätigung neuer CD8-Epitope durch den immunologischen Nachweis

Im vorangegangenen Abschnitt wurde eine Liste von Kandidaten von neuen Epitopen auf Grundlage von Sequenzanalysen erstellt. Zur Bestätigung müssen weiterführende immunologische Untersuchungen durchgeführt werden, in denen die Existenz neuer Epitope bestätigt wird. Das komplette Verfahren wird am Beispiel des HLA-B*15-Allels im Folgenden dargestellt. (Abbildung 3.9 A) zeigt die p-Werte für die Assoziation zwischen dem B*15-Allel und Mutationen für jede einzelne Position der gesamten Region NS3 bis NS5B.

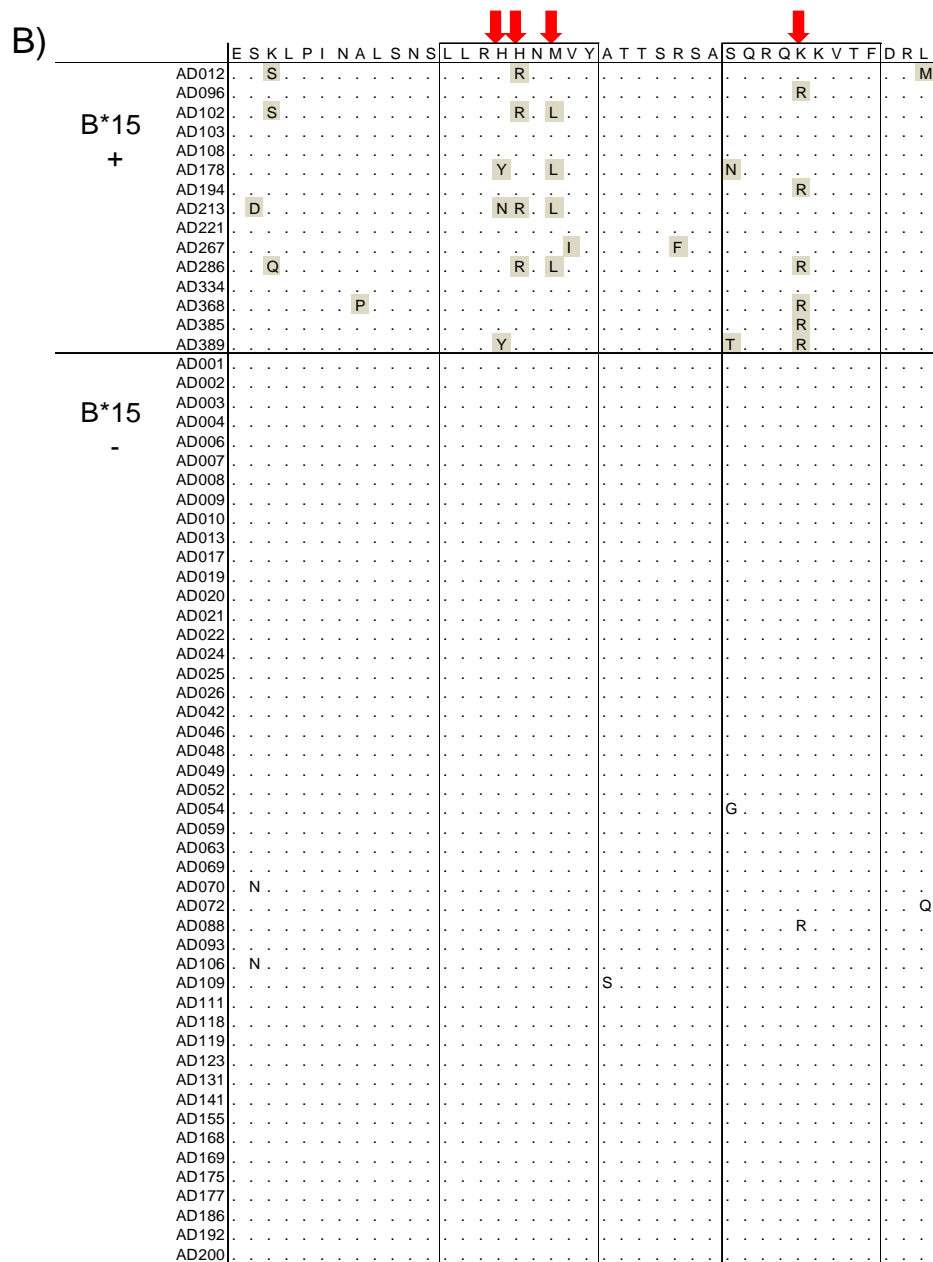


Abbildung 3.9: Identifizierung unbekannter CD8-Epitope. A) Darstellung der Polymorphismen in den Nicht-Strukturproteinen NS3 bis NS5B in Anwesenheit des HLA-B*15-Allels (dargestellt durch graue Punkte). Die gestrichelte Linie stellt die willkürliche

Grenze bei einem p-Wert $< 0,01$ dar. Oberhalb dieser Grenze liegen 10 Positionen (große rote Punkte), wovon vier in einem begrenzten Bereich von NS5B vorkommen (eingefasst durch ein Rechteck). B) Detailliertes Alignment der Region 2448–2477 in NS5B. Die Sequenzen der Anti-D Kohorte wurden in HLA-B*15 positive und negative Patienten aufgeteilt. Die potentiellen CD8-Epitope wurden eingerahmt. Die Positionen der Polymorphismen innerhalb der CD8-Epitope wurden zusätzlich durch rote Pfeile gekennzeichnet.

Die rot markierten Positionen erfüllten die Kriterien von einem p-Wert $< 0,01$. Interessanterweise erkennt man eine Anhäufung mehrerer Mutationen um die Position 2447-2477 in der NS5B Region. Die Detailansicht des Sequenzalignments verdeutlicht nochmals die Mutationen an der Position 2447-2477 (Abbildung 3.9 B). Der Vergleich der HLA-B*15-positiven Patienten (oben) und der HLA-B*15-negativen Patienten (unten) bestätigte, dass die Mutationen vermehrt in den vier Positionen der HLA-B*15-positiven Patienten vorkommen. Wie der Tabelle 3.2 zu entnehmen, konnten für diese Region zwei HLA-B*15-Bindungsmotive mittels Vorhersageprogramms ermittelt werden. Im nächsten Schritt wurden für die möglichen CD8-Epitope Peptide synthetisiert und an Patienten mit dem entsprechenden HLA-Allel getestet. Alle Patienten wiesen eine spontan ausgeheilte HCV-Infektion auf. Mit Hilfe der intrazellulären Zytokin-Färbung (ICS) konnte die IFN- γ -Produktion aktivierter CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.10). Durch dieses Verfahren konnten insgesamt sechs neue Epitope identifiziert werden (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Sechs neue CD8-Epitope.

Position	HLA-Allel	Sequenz
1111-1120	B*07	WPAPSGARSL
1582-1591	B*18	DNFPYLVAY
1871-1880	B*40	GEVPSTEDL
2449-2458	B*15	LLRHHNMVY
2465-2474	B*15	SQRQKKVTF
2835-2844	B*07	APTLWARMVL

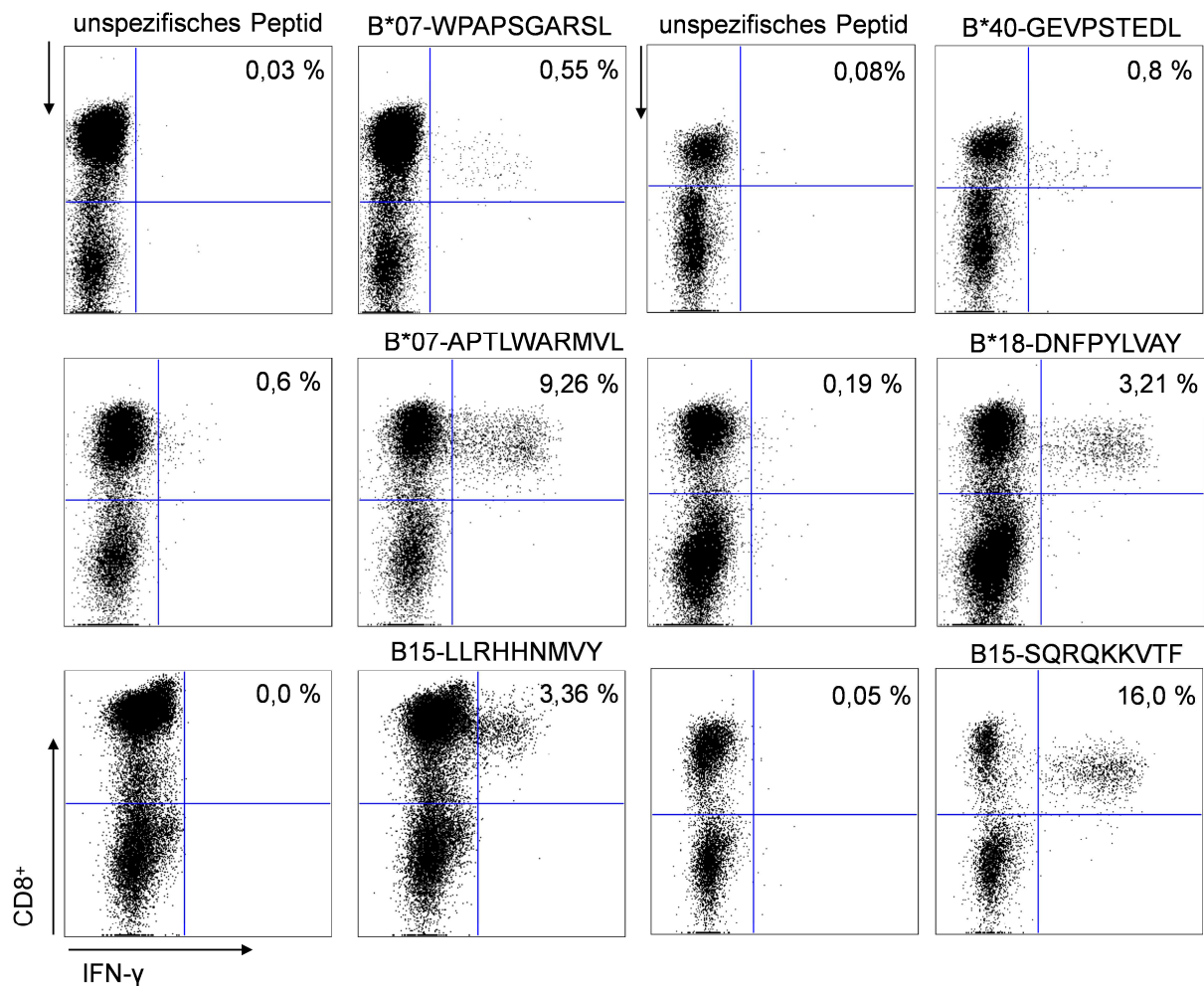


Abbildung 3.10: Ergebnisse der intrazellulären Zytokin-Färbung (ICS) potentieller CD8-Epitope. Der experimentelle Nachweis der CD8-Epitope erfolgte durch die antigen-spezifische Expansion von PBMCs mit dem entsprechenden HLA-Allel. Nach 10 Tagen wurde durch Restimulierung mit dem jeweiligen Peptid der ICS durchgeführt. In allen Experimenten diente eine unspezifische Peptidstimulierung der PBMCs als Negativ-Kontrolle.

Durch detaillierte Sequenzanalysen ist es gelungen eine Assoziation zwischen HLA-abhängigem Selektionsdruck und Mutationen in den Nicht-Strukturproteinen des Virus nachzuweisen.

3.1.7.3 Nachweis des immunologischen „Escape“ der selektierten Epitop-Varianten

Durch die Mutationen, die in Anwesenheit eines spezifischen HLA-Allels vorkamen konnten sechs potentielle CD8-Epitope identifiziert werden. Daher wurde im nächsten Schritt überprüft, ob die Mutationen die Funktionalität des CD8-Epitops einschränken und es sich um „Escape“-Mutationen handelt. Für die CD8-Epitope

wurden Peptide synthetisiert, die den Sequenzvarianten des jeweiligen CD8-Epitops entsprechen. Der Nachweis der möglichen „*Escape*“-Mutationen wurde an drei CD8-Epitopen getestet. Die antigenspezifische Expansion der PBMCs erfolgte durch die Stimulierung mit dem jeweiligen Prototyp-Peptid. Nach 10 Tagen wurden die PBMCs mit der Mutationsvariante erneut stimuliert. Für das neue HLA-B*15-Epitop LLRHHNMVY_{2450–2458} wurden Peptid-Varianten mit den Substitutionen H2453Y, H2454R und M2456L synthetisiert. Hier konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass es sich bei den verschiedenen Substitutionen um „*Escape*“-Mutationen handelt (Abbildung 3.11 A). Im Vergleich zu dem Prototyp-Peptid konnte durch die Restimulierung mit den Peptid-Varianten nur eine sehr geringe IFN- γ -Sekretion nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten für das HLA-B*15-Epitop SQRQKKVTF_{2466–2674} gezeigt werden. Die Restimulierung erfolgte mit der Peptidvariante, die die Substitution Q2470R beinhaltet. Auch hier wurde eindeutig nachgewiesen, dass die Funktionalität des CD8-Epitops durch die „*Escape*“-Mutation eingeschränkt wurde (Abbildung 3.11 B). Für das HLA-B*07-Epitop WPAPSGARSL_{1111–1120} wurden ebenfalls verschiedene Peptide mit den Substitutionen P1112Q und S1115P synthetisiert. Anhand der IFN- γ -Sekretion konnte zwischen der Prototyp-Sequenz und der Peptid-Variante P1112Q unterschieden werden, wohingegen sich die Variante mit der Substitution S1115P kaum von der Prototyp-Sequenz unterscheidet. Eine Erklärung dafür ist, dass die Sequenzvariante (P1115) die gängige Variante in der GT 1b Konsensussequenz ist (Tabelle 3.2). Um den möglichen immunologischen Einfluss dieser Mutationen nachzuweisen, wäre es von Vorteil, ein sensitiveres System zu etablieren, welches z.B. in Abschnitt 3.3.1 beschrieben wurde.

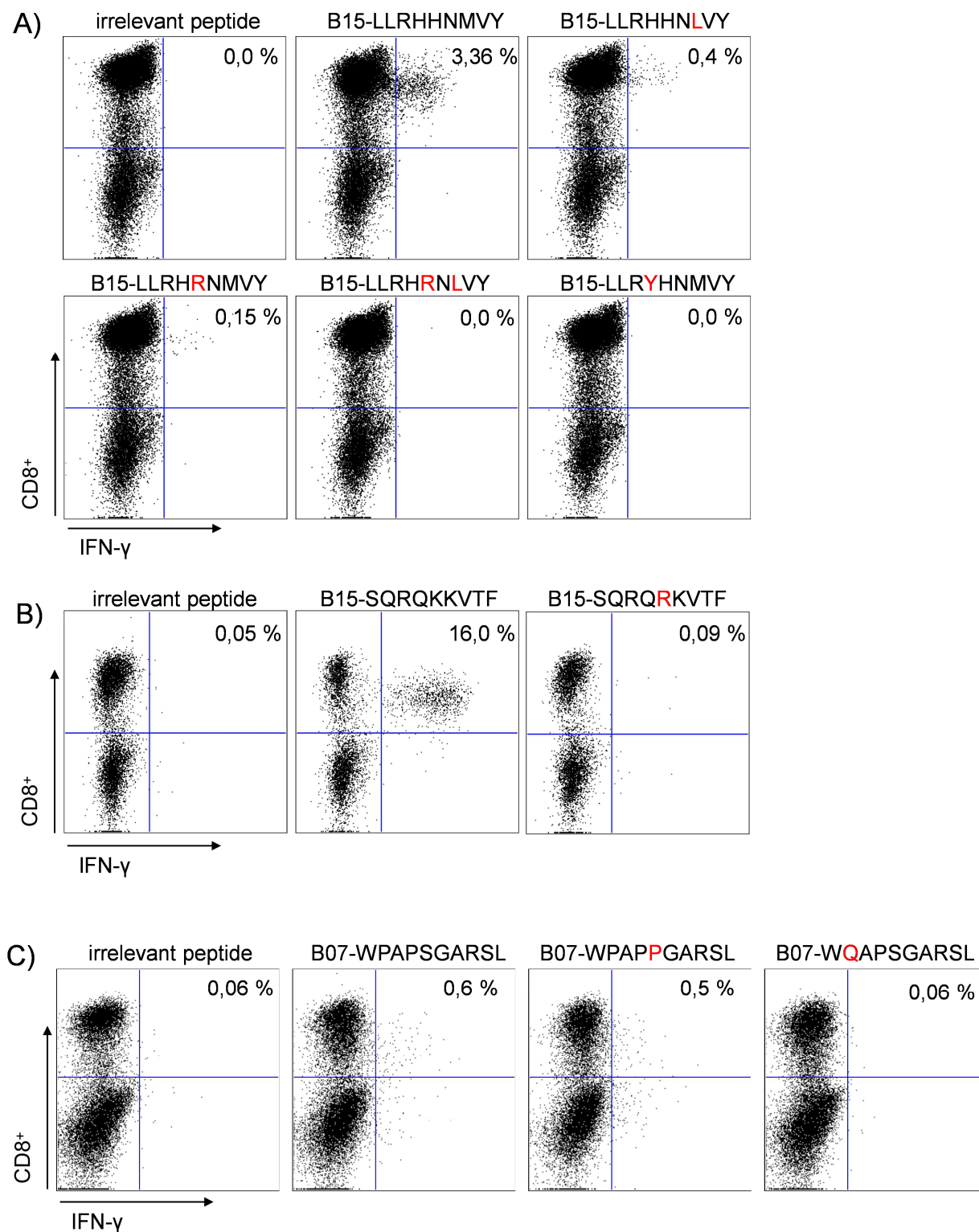


Abbildung 3.11: Ergebnisse der intrazellulären Zytokin-Färbung (ICS) der spezifischen HLA-B*15-Epitope. A) Nachweis des HLA-B*15-Epitops LLRHHNMVY₁₄₅₀₋₁₄₅₈ und der „Escape“-Mutationen in dem Epitop. Spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden durch die Stimulierung mit der Prototyp-Sequenz LLRHHNMVY expandiert und nach 10 Tagen mit den Peptidvarianten restimuliert. Der Nachweis der IFN-γ-Antwort erfolgte mit Hilfe des ICS. B) Nachweis des HLA-B*15-Epitops SQRQKKVTF₁₄₆₆₋₁₄₇₄ und der „Escape“-Mutationen. Spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden durch die Stimulierung mit der Prototyp-Sequenz SQRQKKVTF expandiert und nach 10 Tagen mit den Peptidvarianten restimuliert. Der

Nachweis der IFN- γ -Antwort erfolgte mit Hilfe des ICS. C) Nachweis des HLA-B*07-Epitops WPAPSGARSL_{1111–1120} und der Mutationen. Die Stimulierung und die Restimulierung erfolgten auf die gleiche Weise wie in A) und B) beschrieben. Die abweichenden Varianten vom Prototyp sind rot markiert. In allen Experimenten diente eine unspezifische Peptidstimulierung der PBMCs als Negativ-Kontrolle.

3.1.8 Nachweis des Selektionsdrucks in CD8-Epitopen mit HLA-B-Allel-Restriktion

In den neuen HLA-B*15-Epitopen wurden Mutationen durch den HLA-Allel-abhängigen Selektionsdruck nachgewiesen. Natürlich wurde nicht für alle CD8-Epitope ein statistischer Nachweis für Selektion erbracht. Interessanterweise werden alle sechs neuen CD8-Epitope durch HLA-B-Allele präsentiert.

Tabelle 3.4: Statistischer Nachweis von Selektionen in CD8-Epitopen.

HLA-Allel	Position	Protein	Sequenz	p-Wert
A*02	1273-1282	NS3	GVDPNIRTGV	0,0017
A*02	1406-1415	NS3	QLSGLGINAV	<0,0001
A*03	2510-2518	NS5B	KLTPPHSAK	<0,0001
A*25	1758-1766	NS4B	EAFWAKHMW	0,0005
B*07	1111-1120	NS3	WPAPSGARSL	0,0019
B*07	2836-2845	NS5B	APTLWARMVL	0,0001
B*08	1395-1403	NS3	HSKKKCDEL	<0,0001
B*13	1627-1635	NS3	RLGAVQNEV	0,0028
B*15	2450-2458	NS5B	LLRHHNMVY	<0,0001
B*15	2466-2474	NS5B	SQRQKKVTF	0,0016
B*18	1581-1589	NS3	DNFPYLVAY	0,0000
B*27	2820-2828	NS5B	ARHTPVNSW	0,0003
B*27	2841-2849	NS5B	ARMVLMTHF	0,0141
B*35	1359-1367	NS3	HPNIEEVAL	0,0001
B*38	2794-2804	NS5B	HDASGKRVYYL	<0,0001
B*40	1871-1879	NS4B	GEMPSTEDL	0,0001
B*40	2266-2275	NS5A	REISVPAEIL	<0,0001
B*51	1373-1380	NS3	IPFYGKAI	0,0038

Die Häufigkeit von Selektionen innerhalb bekannter Epitope wurde mit Hilfe des *fisher's exact-Tests* (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/index.html>) durchgeführt (p-Wert < 0,05). Die sechs neuen CD8-Epitope wurden mit einbezogen.

Daher wurde geprüft, ob bestimmte HLA-Allele häufiger Selektionsdruck verursachen. Dazu wurden die 84 beschriebenen CD8-Epitope inklusive der sechs neuen Epitope in die Analyse einbezogen. Die Epitopliste beinhaltet 56 HLA-A-Allel-spezifische CD8-Epitope und 34 HLA-B-Allel-spezifische CD8-Epitope. In insgesamt 18 Epitopen wurde ein statistischer Hinweis auf Selektionsdruck in Anwesenheit des relevanten Allels gefunden (Tabelle 3.4). Lediglich vier dieser Epitope wurden durch das HLA-A-Allel präsentiert. Im Gegensatz dazu findet man einen statistischen Hinweis auf Selektionsdruck in 14 von 34 Epitopen (41,1 %), die durch HLA-B-Allele präsentiert werden (Abbildung 3.12). Dies deutet darauf hin, dass HLA-B-Allele mit einer höheren Reproduzierbarkeit Selektionsdruck auslösen. Die meisten Epitope wurden für das häufige HLA-A*02-Allel beschrieben. Einige dieser Epitope basieren auf Vorhersagen von Bindungspartnern, und die immunologischen Daten sind teilweise widersprüchlich. Daher wurde die Analyse ohne die HLA-A*02-restringierten Epitope wiederholt. Selbst ohne diese Epitope sind HLA-B-restringierte Epitope signifikant häufiger unter Selektionsdruck ($p < 0,001$).

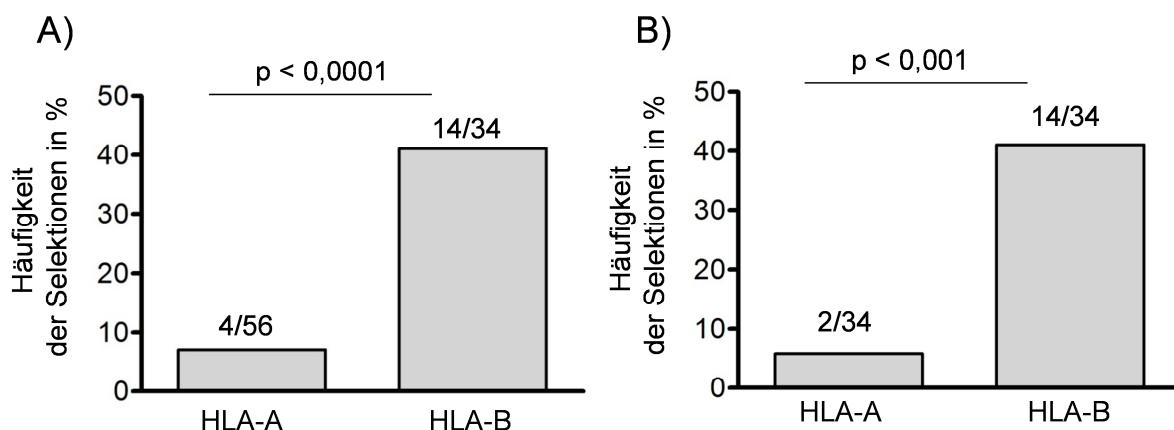


Abbildung 3.12: Statistischer Nachweis des Selektionsdrucks in beschriebenen CD8-Epitopen. A) CD8-Epitope wurden in ihre spezifischen HLA-Allel-Restriktionen aufgeteilt (HLA-A-Allel und HLA-B-Allel). B) Nachweis des Selektionsdrucks in den CD8-Epitopen ohne die HLA-A02-restringierten CD8-Epitope. Die Häufigkeit der Mutationen in den CD8-Epitopen der HLA-A- und HLA-B-restringierten Allele wurde mit Hilfe des *fisher's exact*-Test ermittelt.

3.2 Einfluss von „*Escape*“-Mutationen auf die virale Fitness

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass „*Escape*“-Mutationen in spezifischen CD8-Epitopen reproduzierbar selektiert werden. In Abwesenheit des Immundrucks auf das Virus kann es jedoch zur Reversion der „*Escape*“-Mutationen (Timm et al. 2004; Ray et al. 2005) kommen. Entscheidend ist dabei der Einfluss der Mutationen auf die virale Fitness. Anhand von *in vitro*-Studien konnte für einige Epitope nachgewiesen werden, dass durch die Anwesenheit von „*Escape*“-Mutationen die Virusreplikation herabgesetzt wird (Salloum et al. 2008; Uebelhoer et al. 2008). Darauf aufbauend stellt sich die Frage, ob bei CD8-Epitopen, die unter starkem Selektionsdruck stehen, weitere Mutationen die viralen Fitnesskosten kompensieren. In den folgenden Abschnitten wurden kompensatorische Mutationen in Assoziation mit „*Escape*“-Mutationen der HLA-B*15-spezifischen Epitope untersucht. Dabei wurden die Sequenzen der Anti-D Kohorte verwendet und die NS5B-Region detaillierter analysiert.

3.2.1 Mutationen in der Region der HLA-B*15-restringierten CD8⁺ T-Zell-Epitope in NS5B

Für die Mutationsanalyse der NS5B Region stand ein erweiterter Datensatz von insgesamt 113 Sequenzen der Anti-D Kohorte zur Verfügung (Referenznummer HQ908282-HQ908359, JN377747-JN377781). Diese wurden wieder in 15 HLA-B*15-positive Patienten und 98 HLA-B*15-negative Patienten aufgeteilt und mit der Konsensussequenz der Infektionsquelle verglichen (Abbildung 3.13). Für die NS5B-Region konnte kein Unterschied zwischen der Konsensussequenz der Infektionsquelle und der allgemeinen GT 1b Konsensussequenz aus der HCV-Datenbank beobachtet werden.

	2439												2450					2458					2466					2474															
Anti-D Konsensus	E	S	K	L	P	I	N	A	L	S	N	S	L	L	R	H	H	N	M	V	Y	A	T	T	S	R	S	A	S	Q	R	Q	K	K	V	T	F	D	R	L	n		
B*15-positive Patienten	4/15
	.	S	R	.	L	M	1/15	
	.	S	R	.	L	1/15	
	.	Q	R	.	L	R	1/15	
	.	D	N	R	.	L	N	1/15		
	P	Y	.	L	R	1/15	
	Y	T	.	.	R	1/15		
	I	F	R	1/15		
	R	3/15	
B*15-negative Patienten	91/98
	.	N	3/98
	.	N	S	1/98	
	C	1/98	
	R	1/98	
GT1b Konsensus	G	1/98	
AF176573.	.	Q	R	.	L	1/332	
EF407477.	.	A	N	R	.	I	1/332	
EU256061.	.	Q	R	1/332
EU256081.	.	Q	N	R	1/332

Abbildung 3.13: Alignment der NS5B-Region 2439-2477 mit den HLA-B*15-spezifischen Epitopen LLRHHNMVY₂₄₅₀₋₂₄₅₈ und SQRQKKVTF₂₄₆₆₋₂₄₇₄. Darstellung der Sequenzen der HLA-B*15-positiven und -negativen Patienten aus der Anti-D Kohorte. Polymorphismen, die statistisch mit dem HLA-B*15-Allel assoziiert sind, sind grau unterlegt. Die Konsensussequenzen des Genotyps 1b wurde aus der HCV-Datenbank entnommen (<http://hcv.lanl.gov/>).

In dem HLA-B*15-Epitop LLRHHNMVY₂₄₅₀₋₂₄₅₈ weisen sieben der 15 Patienten Mutationen auf. Die Mutationen an Position 2453, 2454 und 2456 innerhalb des Epitops wurden bereits als „Escape“-Mutationen anhand funktioneller Analysen bestätigt (Abbildung 3.11). Für das HLA-B*15-Epitop SQRQKKVTF₂₄₆₆₋₂₄₇₄ konnte man ebenfalls sieben von 15 Patienten mit Mutationen feststellen. Auch hier wurde die „Escape“-Mutation an Position 2470 funktionell bestätigt. Zusätzlich treten an Position 2466 die Aminosäuren Asparagin (N) und Threonin (T) als Substitutionen auf. Betrachtet man die Polymorphismen außerhalb der Epitope, so fällt auf, dass in Position 2440 die Substitutionen Serin (S) oder Glutamin (Q) ebenfalls signifikant mit dem HLA-B*15-Allel assoziiert sind. Ein Bindungsmotiv für das B*15-Allel existiert an dieser Stelle nicht. Allerdings fällt auf, dass die Mutationen in Position 2440 in Kombination mit der Mutation H2454R des HLA-B*15-spezifischen LLRHHNMVY₂₄₅₀₋₂₄₅₈-Epitops vorkommen. Daher wurden alle Genotyp 1b Sequenzen aus der Datenbank untersucht. Der H2454R-Polymorphismus wurde in vier weiteren Sequenzen aus der HCV-Datenbank gefunden. In allen vier Sequenzen trat der Polymorphismus in Kombination mit einem Polymorphismus in Position

K2440 auf (dreimal K2440Q und einmal K2440A). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Mutationen außerhalb des HLA-B*15-Epitops in Position K2440 bei der Kompensation von Fitnesskosten im Zusammenhang mit der H2454R-Mutation eine Rolle spielt. Das NS5B-Protein ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase von HCV. In der Struktur der Polymerase fällt auf, dass trotz der relativ großen linearen Distanz in der Sequenz die räumliche Distanz in der Struktur sehr klein ist (Abbildung 3.14). Daher erscheint eine Interaktion zwischen den Positionen H2454 und K2440 durchaus möglich.

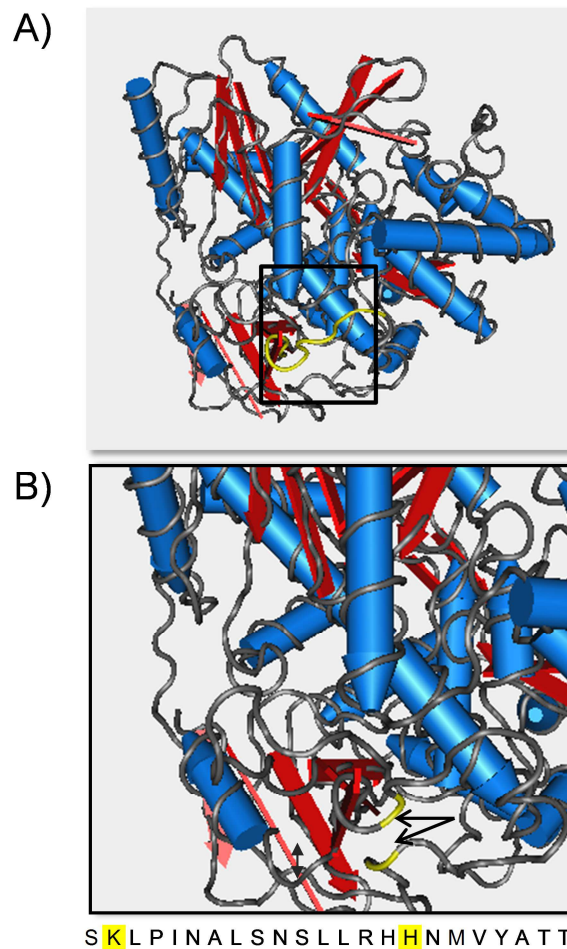


Abbildung 3.14: Dreidimensionale Proteinstruktur von NS5B. A) Die Domänen der Proteinstruktur sind aufgeteilt in α -Helix (rot) und β -Faltblatt (blau). Die unstrukturierte Polypeptidkette wurde in grau dargestellt. Die HLA-B*15-Epitopregion LLRHHNMVY ist gelb markiert. B) Vergrößerung der HLA-B*15-Epitopregion. Die Position K2440Q sowie die „Escape“-Mutation H2454R sind in gelb dargestellt. Die schwarzen Pfeile markieren die Positionen der Mutationen.

3.2.2 Nachweis des kompensatorischen Effekts der K2440Q-Mutation

Um die Assoziation der kompensatorischen Mutationen und der viralen Fitness des Hepatitis C Virus nachzuweisen, wurde ein GT 1b-spezifisches subgenomisches Replikon (Con1) verwendet. Dabei wurden die kompensatorischen Mutationen sowie die „*Escape*“-Mutationen in das Plasmid Con1 mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese (SDM) integriert. Die einzelnen Konstrukte dienten als Vorlage und wurden in RNA umgeschrieben. Anschließend wurden die RNA-Konstrukte mit Hilfe der Elektroporation in die Hepatoma-Zelllinie (Huh7-Zellen) transfiziert. Der Nachweis der Replikation erfolgte über das Luziferase-Reportergen-System. Nach Transfektion der Konstrukte in die Huh7-Zellen wurde die Luziferaseaktivität nach vier Stunden (h) gemessen. Die darauffolgenden Messungen nach 24, 48, 72 und 96 h wurden mit dem Kontrollwert (4 h) standardisiert. Zusätzlich wurden die Ergebnisse des Replikationsassays von dem Institut für experimentelle Virologie aus Hannover (TWINCORE) validiert.

Die Luziferaseaktivität wurde mit Hilfe der relativen Lichteinheit (RLU) gemessen und entspricht der Replikation der Plasmide in den transfizierten Huh7-Zellen. Der Verlauf der Replikation für das Konstrukt mit der Konsensussequenz GT 1b, welches auch der Sequenz der Anti-D Kohorte entspricht, stellt den üblichen Verlauf dar. Nach 24 h konnte ein deutlicher Anstieg der Replikation beobachtet werden.

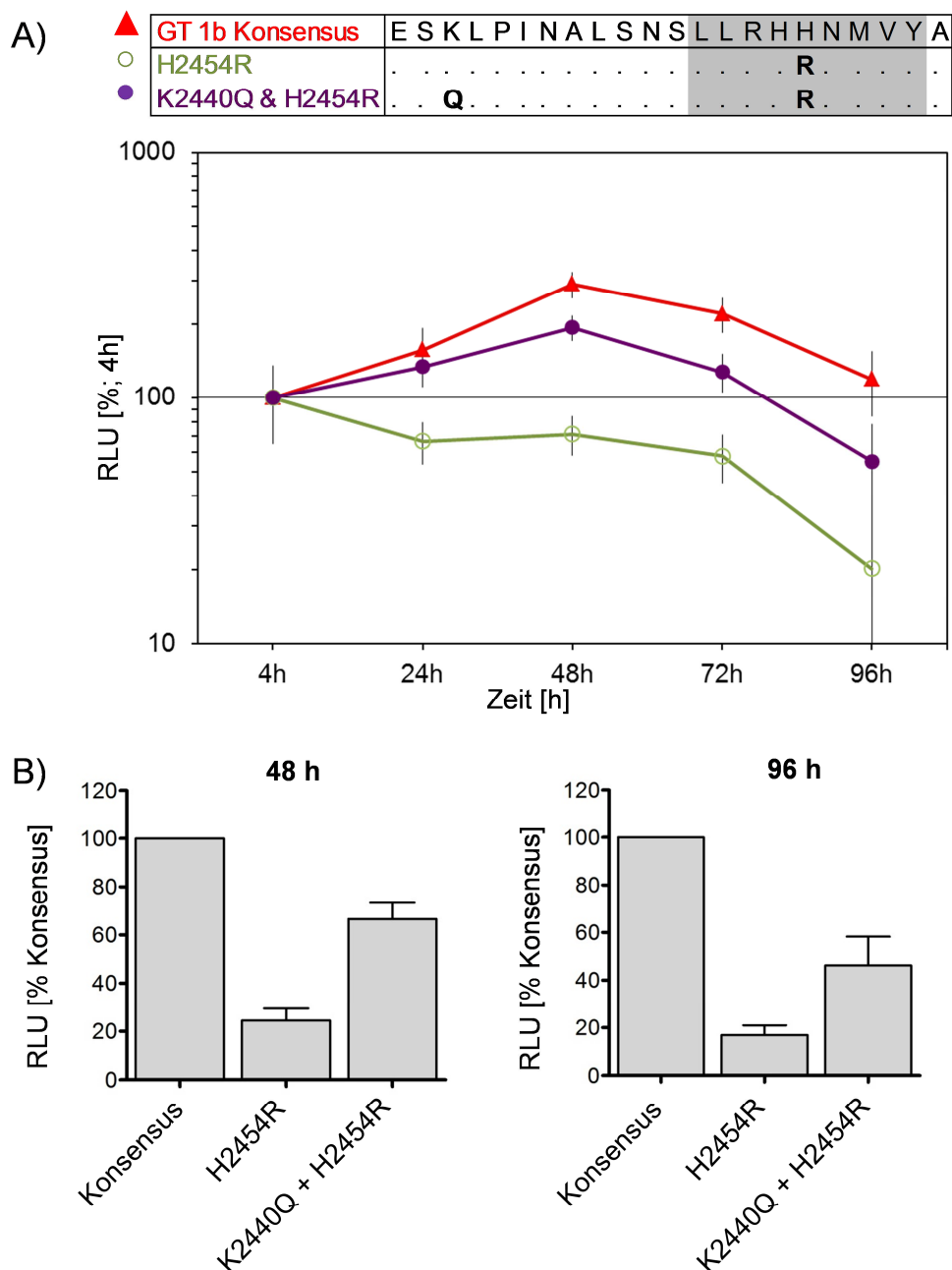


Abbildung 3.15: Auswirkung der kompensatorischen Mutationen im HCV-Replikationsassay. A) Darstellung der verschiedenen Alignments, die mit Hilfe der SDM erstellt wurden und an dem transienten HCV-Replikonsystem Con1 getestet wurden. Die eingebauten Mutationen sind grau unterlegt. B) Die Luziferase-Aktivität wurde von jedem Konstrukt nach 4, 24, 48, 72 und 96 h gemessen. Dabei wurde die Luziferase-Aktivität auf den 4 h-Wert standardisiert. C) Vergleich der Ergebnisse der Luziferase-Aktivität nach 48 und 96 h. Die Luziferase-Aktivität jeder Konstrukte wurde mit dem 48 h bzw. 96 h Wert standardisiert.

Ausgehend von dem Kontrollwert konnte nach 48 h ein Anstieg der Replikation gemessen werden (290 RLU). Im Verlauf der 72 h- und 96 h-Messung reduzierte sich die Replikation des GT 1b-Konstruktes wieder in den Bereich des Kontrollwertes

(100 RLU). Als nächstes wurde das Konstrukt mit der „Escape“-Mutation H2454R getestet. Diese Substitution in dem HLA-B*15-Epitop LLRHHNMVY₂₄₅₀₋₂₄₅₈ führte zu einer drastisch reduzierten Replikation. Bei den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 h konnte keine Replikation gemessen werden. Das Konstrukt K2440Q & H2454R enthält beide Substitutionen. Dieses zeigte nach 24 h einen leichten Anstieg der Replikation und erhöhte sich nach 48 h (193 RLU). Die Messwerte nach 72 und 96 h veranschaulichen den klassischen Verlauf der Replikation, wobei nach 96 h wiederum keine Replikation mehr gemessen werden konnte.

Das Konstrukt mit der „Escape“-Mutation H2454R zeigte eine deutliche Reduzierung der Replikation auf 24 % (Vergleich zum GT 1b Konsensus-Konstrukt nach 48 h). Erst durch die zusätzliche Substitution K2440Q konnte das Replikationsniveau auf 67 % im Vergleich zum GT 1b Konsensus-Konstrukt erhöht werden (nach 48 h) (Abbildung 3.15 B).

3.3 Die Auswirkung von Substitutionen auf spezifische CD8-Epitope und der Antigen-Prozessierung

Im vorherigen Abschnitt haben wir gesehen, dass das Hepatitis C Virus durch Selektion von Mutationen die Immunantwort des Wirtes unterbinden kann. Typischerweise liegen diese Mutationen in dem Zielepitop und können die spezifischen Interaktionen mit CD8⁺ T-Zellen behindern. Dazu werden synthetische Peptide eingesetzt, die den Zielepitopen bzw. den Sequenzvarianten entsprechen. In einigen Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass auch Mutationen in den flankierenden Regionen von CD8-Epitopen das komplexe System der Antigen-Prozessierung beeinträchtigen können (Seifert et al. 2004). Hier besteht methodisch die Schwierigkeit, dass die Mutation eben nicht im Epitop liegt und damit die üblichen Untersuchungen mit Hilfe von synthetischen Peptiden nicht möglich sind. Im Falle der HLA-B*15-assoziierten Mutationen in der flankierenden Region handelte es sich am ehesten um Mutationen, die die virale Fitness des Virus kompensieren. Allerdings wurde formal die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass die Mutation die Prozessierung des Antigens beeinträchtigt. Daher sollte ein System entwickelt werden, in dem die Präsentation und Erkennung von endogen prozessierten Antigenen untersucht werden kann. Hierzu wurde ein kommerzieller Expressionsvektor verwendet (pAcGFP-N1), in dem das HCV CD8-Epitop inklusive der flankierenden Region mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert

wurde. Der Vektor wurde in Zellen transfiziert, in denen die endogene Prozessierung des Epitops erfolgen sollte. Diese transfizierten Zellen konnten dann als Zielzelle für spezifische CD8⁺ T-Zellen eingesetzt werden.

3.3.1 Etablierung eines Systems zum Nachweis endogen prozessierter CD8-Epitope

Im ersten Schritt war es erforderlich, ein transientes Expressionssystem zu erstellen, welches ein spezifisches Epitop zusammen mit den flankierenden Regionen exprimiert. Zur Etablierung des Systems wurde eine Region in NS3 ausgewählt, in dem mehrere immundominante Epitope liegen. Außerdem sollte ein weiteres Kontroll-CD8-Epitop in dem Vektor kodiert werden, das unabhängig von einer HCV-Infektion häufig erkannt wird. Für diese Kontrolle wurde das HLA-A-restringierte Influenza-Epitop GILGFVFTL₅₈₋₆₆ ausgewählt. Für die ersten Experimente wurde der Vektor pAcGFP-FLU-A2 konstruiert. Damit die Prozessierung erfolgen konnte, wurde das Influenza-Epitop in flankierende Regionen eines immundominanten HCV-spezifischen CD8-Epitops integriert. Zur Optimierung der GFP-Expression wurde noch ein Glycin-Linker eingebaut (Abbildung 3.16). Bei der Testung unterschiedlicher Transfektionssysteme erwies sich die Elektroporation mit dem Nukleofector II-System der Firma Lonza am produktivsten.

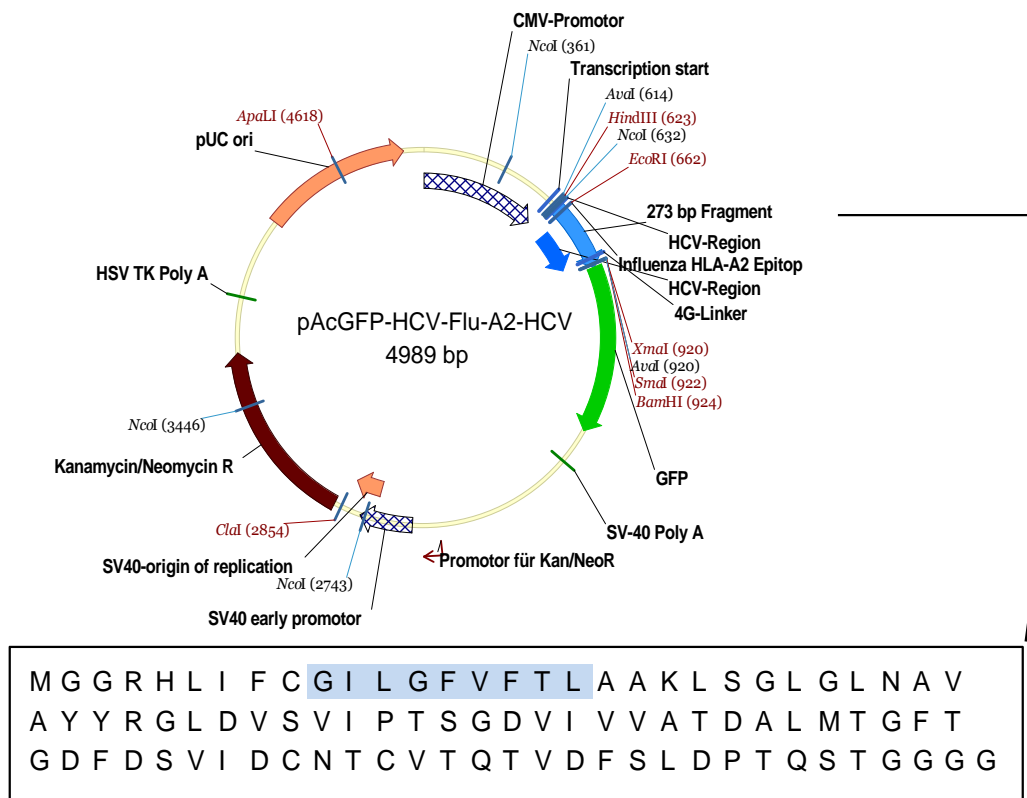


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung des Vektors: pAcGFP-FLU-A2. Der Vektor verfügt über einen CMV-Promotor, dem Reportergen GFP sowie den Resistenzgenen Kanamycin und Neomycin und einer multiplen Klonierungsseite (MCS). Zwischen der Restriktionsschnittstelle *Hind* III und *Kpn* I wurde das ca. 273 bp große Fragment eingebaut. Dieses beinhaltet die C-terminale Region des immundominanten HCV-spezifischen CD8-Epitops, das A2-Flu-Epitop GILGFVFTL (in blau dargestellt), die N-terminale Region des HCV-spezifischen CD8-Epitops sowie den 4G-Linker.

Für zukünftige Experimente war es notwendig ein Zellkultursystem zu verwenden, das nicht auf ein spezielles HLA-Allel limitiert ist. Über die Blutbank der Uniklinik Essen stehen PBMCs in großen Mengen von Spendern unterschiedlicher HLA-Konstellationen für diese Experimente zur Verfügung. Daher wurde das System für die Transfektion von PBMCs optimiert. Um die Antigen-Prozessierung des HLA-A02-Flu-Epitops zu ermöglichen, wurden HLA-A*02-positive PBMCs aus *Buffy-coats* von Vollblutspenden isoliert und transfiziert. Die GFP-Expression wurde nach 24 h zytometrisch gemessen (FACS-Calibur, Becton Dickinson).

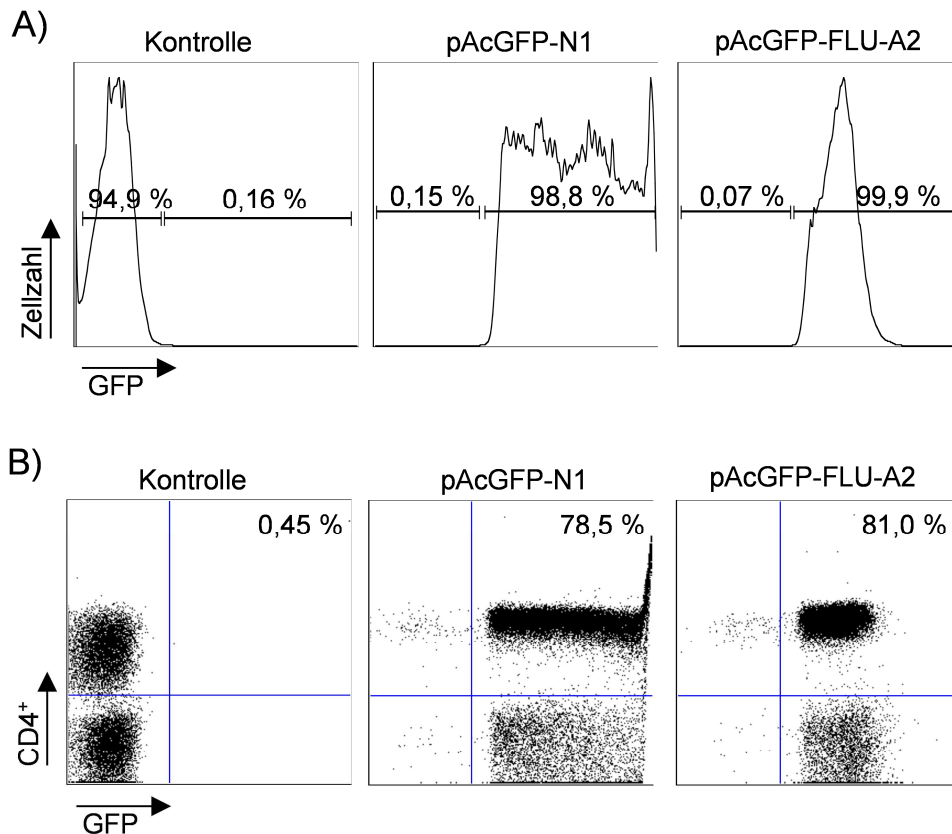


Abbildung 3.17: Darstellung der Fluoreszenz-Messung von nicht-transfizierten und transfizierten PBMCs. Die PBMCs wurden mit Hilfe des Nucleofector II Device-System (Lonza) transfiziert. Die GFP-Expression wurde nach 24 h gemessen. Die Transfektion erfolgte mit den Vektoren pAcGFP-N1 und pAcGFP-FLU-A2. Die Transfektion ohne Vektor diente als Kontrolle. A) Vergleich des GFP-Expressionslevels in den einzelnen Vektoren sowie der Kontrolle. B) Darstellung der GFP-Expression der CD4⁺-Zellen in den einzelnen Vektoren sowie der Kontrolle.

Bezogen auf die Gesamtzahl der lebenden PBMCs wurde die Intensität der GFP-Expression in den Zellen ermittelt. Eine starke GFP-Expression konnte nach Transfektion mit dem pAcGFP-N-1 Vektor und dem pAcGFP-FLU-A2 Vektor gemessen werden (Abbildung 3.17 A). Die Intensität der GFP-Expression bei dem kommerziellen Vektor pAcGFP-N1 war jedoch deutlich höher (mittlere Fluoreszenzintensität 1813) als bei dem pAcGFP-FLU-A2-Vektor (mittlere Fluoreszenzintensität 212). Betrachtet man die GFP-Expression in den PBMCs durch den kommerziellen pAcGFP-N1-Vektor so ist zu erkennen, dass die Intensität oberhalb des darstellbaren Bereichs liegt (Abbildung 3.17 B). Insgesamt scheinen CD4⁺ T-Zellen häufiger positiv für GFP zu sein als CD8⁺ T-Zellen. Die Anzahl der CD4⁺-GFP⁺-Zellen mit dem pAcGFP-FLU-A2-Konstrukt-Vektor liegt bei 81 %.

Tabelle 3.5: Werte der Fluoreszenzintensität für GFP

	Zielzellen	Ko-Kultur
Intensität der Fluoreszenz	\bar{x}	\bar{x}
Kontrolle	4,78	10,4
pacGFP-N1	1813	283
pAcGFP-FLU-A2	212	40

Die Werte wurden aus Gesamtzahl der lebenden Zellen und der GFP-Expression ermittelt (FlowJo 9.1).

Unter dem Prozess der Elektroporation gab es allerdings einen ganz erheblichen Zellverlust. Daher wurden in Kooperation mit der medizinischen Mikrobiologie nach der Transfektion alle GFP⁺-Zielzellen via FACS-Aria II sortiert. Dadurch wurde die Reinheit der GFP⁺-Zielzellen in der vorhandenen Probe deutlich erhöht (Daten nicht dargestellt). Im nächsten Schritt erfolgte die Ko-Kultur von Effektorzellen und Zielzellen. Als Effektorzellen wurden ebenfalls HLA-A*02-positive PBMCs aus *Buffy-coats* von Vollblutspendern isoliert. Durch die Stimulierung mit dem Flu-A2-Peptid konnten die Effektorzellen expandiert und nach 10 Tagen mit den transfizierten, sortierten GFP⁺-Zielzellen restimuliert werden. Die endogene Antigen-Prozessierung wurde durch die Produktion von IFN- γ der aktivierten CD8⁺ Effektorzellen belegt. Parallel zu der Ko-Kultur wurden die expandierten Effektorzellen nach 10 Tagen mit dem Flu-A2-Peptid restimuliert.

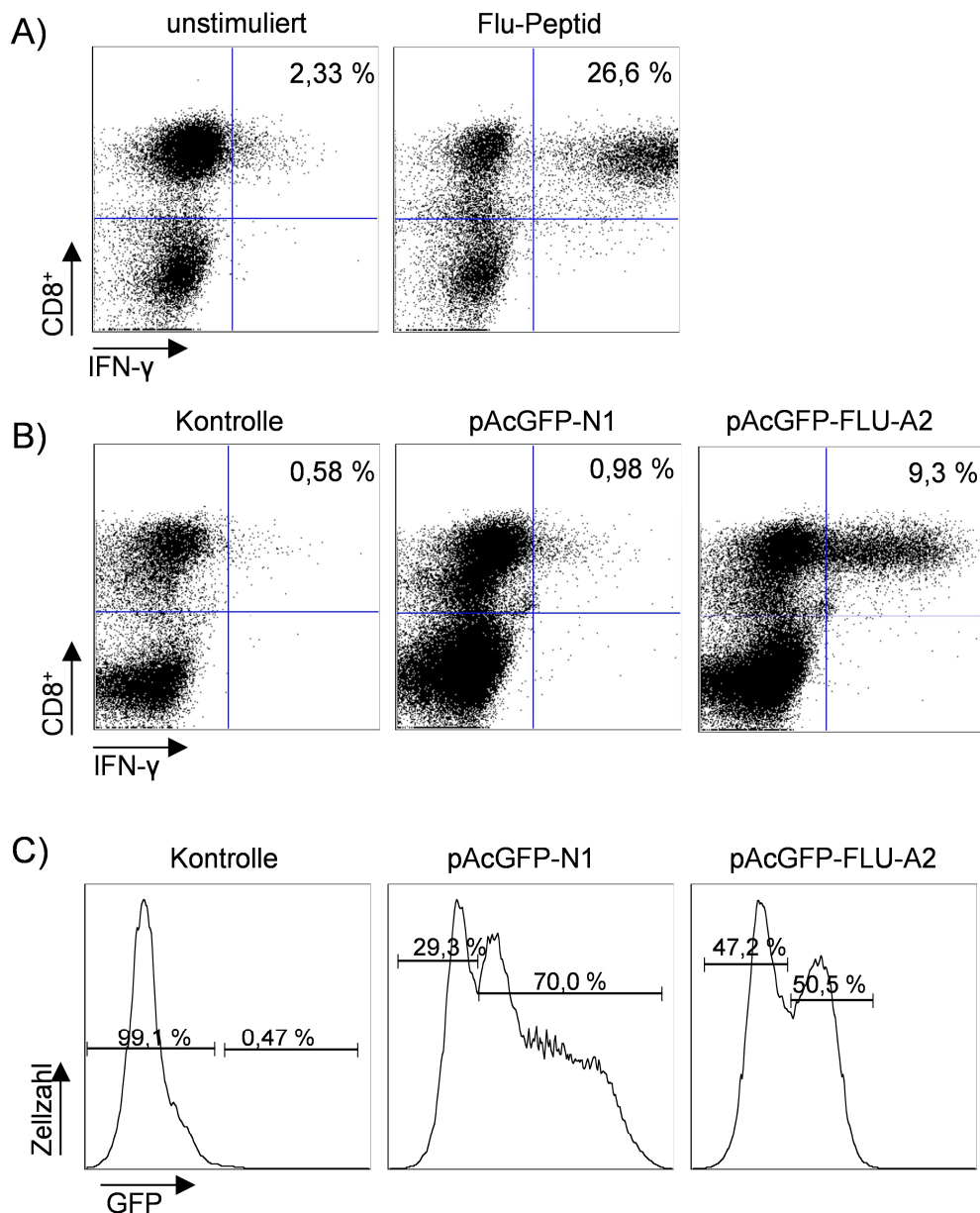


Abbildung 3.18: Ergebnisse der intrazellulären Zytokin-Färbung nach Ko-Kultur der Effektor- und Zielzellen. A) Expansion der Effektorzellen mit dem synthetischen Flu-A2-Peptid. Nach 10 Tagen wurden die Zellen mit dem Flu-A2-Peptid restimuliert. B) Ko-Kultur der Effektor- und Zielzellen. Die Effektorzellen wurden durch Stimulierung mit dem synthetischen Flu-A2-Peptid expandiert und nach 10 Tagen mit den transfizierten Zielzellen restimuliert. Für die Kontrolle wurden Effektorzellen mit Zielzellen kultiviert, die ausschließlich elektroporiert wurden. C) Nachweis der GFP-Expression in der Ko-Kultur.

Um eventuelle allogene Reaktionen der beiden Zellpopulationen oder eine falsch-positive Reaktion durch die transfizierten GFP⁺-Zielzellen auszuschließen, wurden zusätzliche Kontrollen durchgeführt. Zum einen wurden die Effektorzellen mit Zielzellen restimuliert, die ausschließlich elektroporiert wurden. Des Weiteren wurden die Effektorzellen mit Zielzellen restimuliert, die den kommerziellen Vektor

pAcGFP-N1 beinhalten. In beiden Kontrollen konnte keine IFN- γ -Produktion von CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden.

Abbildung 3.18 zeigt sehr deutlich, dass durch die Restimulierung mit Zielzellen welche den pAcGFP-FLU-A2-Vektor beinhalten, die Produktion von IFN- γ durch CD8⁺ Effektorzellen erfolgte. Zwar liegt die IFN- γ -Antwort deutlich unter dem Wert der herkömmlichen Restimulierung durch das synthetische Peptid, jedoch konnte der Nachweis erbracht werden, dass nach Integration des pAcGFP-FLU-A2-Vektors in die Zielzellen, diese in der Lage waren, durch die Antigen-Prozessierung das spezifische Flu-A2-Epitop über den HLA-Klasse-I-Peptidkomplex zu präsentieren. Durch das Auslesen der GFP⁺-Zielzellen am FACS-Aria II konnte eine erhöhte Intensität der GFP-Expression gemessen werden. Es ist jedoch klar zu erkennen, dass diese keinen Einfluss auf die IFN- γ -Antwort hatte und lediglich als Kontrolle für die GFP⁺-Zielzellen diente (Abbildung 3.18). Mit dem abschließenden Experiment konnte gezeigt werden, dass die Zielzellen durch die endogene Prozessierung und Präsentation des gewünschten CD8-Epitops, in der Lage sind, Effektorzellen zu stimulieren.

4 Diskussion

4.1 Der Einfluss von HLA-Klasse I-assoziiertem Immundruck auf die Evolution von HCV in der Anti-D Kohorte

Die Anpassung des Hepatitis C Virus an den Immundruck der CD8⁺ T-Zellen durch die Selektion von „Escape“-Mutationen in den spezifischen CD8-Epitopen wurde ausführlich in individuellen Patienten mit einer akuten Infektion beschrieben (Timm et al. 2004; Tester et al. 2005; Cox et al. 2005a). Auf Populationsebene konnte durch den Nachweis von Assoziationen von Sequenzpolymorphismen in viralen Proteinen und Expression von spezifischen HLA-Allelen verdeutlicht werden, dass der Selektionsdruck in einigen CD8-Epitopen reproduzierbar ist (Gaudieri et al. 2006; Timm et al. 2007). In dieser Studie wurde die Analyse erweitert und der Zusammenhang zwischen dem Immundruck der CD8⁺ T-Zellantwort und der evolutionären Entwicklung der Nicht-Strukturproteine NS3 bis NS5B des Hepatitis C Virus detailliert charakterisiert. Ein wesentlicher Vorteil in dieser Studie ist die Verwendung von Probenmaterial aus einem großen Ausbruch, bei dem die Infektionsquelle bekannt ist. Aufgrund HCV-kontaminierter Anti-D Immunglobuline, die während der Rhesusprophylaxe verabreicht wurden, kam es in den Jahren 1977/78 zur Infektion von über 2867 schwangeren Frauen (Wiese et al. 2000). Ein ähnlicher HCV-Ausbruch in Irland im Jahre 1977 wurde ebenfalls durch kontaminierte Anti-D Immunglobuline verursacht (Kenny-Walsh 1999).

In den meisten Publikationen wurde die Ostdeutsche Anti-D Kohorte als ein Ausbruch beschrieben, welcher von einer HCV-Variante (AD78) ausging (Rispeter et al. 2000; Wiese et al. 2000; Seifert et al. 2004; Wiese et al. 2005). Die aktuelle phylogenetische Studie beruht auf einer großen Anzahl von HCV-Sequenzen der Patienten (78 Sequenzen), die die Gene der Nicht-Strukturproteine NS3 bis NS5B kodieren, sowie auf klonalen Sequenzen aus der Infektionsquelle (Immunglobulin-Chargen 8 und 12). Die Patienten-Sequenzen bilden drei phylogenetische Gruppen, die sich auch nach 30 Jahren noch eindeutig von anderen Genotyp 1b Sequenzen aus der Datenbank unterscheiden lassen (Abbildung 3.1). Anhand der phylogenetischen Analysen der einzelnen Nicht-Strukturproteine NS3 und NS5B konnte außerdem gezeigt werden, dass die drei Gruppen von drei verschiedenen Varianten aus der Infektionsquelle abstammen (Abbildung 3.2). Die

Tatsache, dass die klonalen Sequenzen der Infektionsquelle und die Sequenzen der Anti-D Patienten drei separate Gruppen bilden, lässt annehmen, dass mindestens drei verwandte HCV-Varianten in den kontaminierten Immunglobulin-Chargen präsent waren. In der phylogenetischen Analyse von Sequenzen der Irischen Anti-D Kohorte wurde ebenso eine separate phylogenetische Gruppe der Patientensequenzen von unabhängigen Genotyp 1b Isolaten nachgewiesen. Allerdings können keine weiteren Gruppen innerhalb der Irischen Kohorte nachgewiesen werden, sodass die Irische Anti-D Kohorte tatsächlich auf Infektionen mit nur einer HCV-Variante zurückzuführen ist (Ray et al. 2005). Der Ursprung der drei HCV-Varianten in der Ostdeutschen Kohorte ist jedoch unklar. Eine Möglichkeit wäre, dass die Originalspenderin eine HCV-Variante in die fünf Plasmaspenderinnen übertrug und sich in dem Zeitfenster bis zur Separation aufgrund unterschiedlicher Replikationsbedingungen drei verschiedene HCV-Varianten entwickeln konnten. Das Plasma von diesen fünf Frauen wurde erneut für die Herstellung der Immunglobulinpräparate gepoolt. Die schwangeren Frauen wurden daraufhin mit den kontaminierten Anti-D Immunglobulinen immunisiert und mit allen drei HCV-Varianten infiziert. Leider steht zurzeit von der Originalspenderin oder den Plasmaspenderinnen kein Material zur Verfügung, um dieser Frage nachzugehen. Nach 30 Jahren dominierte in den Patienten mit chronischer Infektion nur eine HCV-Variante. Auch in klonalen Untersuchungen von repräsentativen Patienten mit chronischer Infektion ließ sich in der Quasispezies immer nur eine Variante finden. Da alle Frauen das gleiche Volumen der Immunglobuline bekommen haben, kann eine Selektion durch Übertragung einer nur sehr kleinen Stichprobe („*Bottleneck*“) ausgeschlossen werden. Allerdings kann das „*Bottleneck*“-Phänomen auch so definiert werden, dass die für den jeweiligen Wirt optimale Variante (z.B. zum Eindringen in die Zelle) in der frühen Phase der Infektion selektiert wird. Das kann soweit gehen, dass die initiale Infektion durch nur einen molekularen Klon der Quasispezies ausgelöst wurde. Anhand von HIV-Infektionen wurde beobachtet, dass das „*Bottleneck*“-Phänomen die genetische Diversität und die Bildung viraler Varianten maßgeblich beeinflusst (Boutwell et al. 2010; Bar et al. 2010; Keele et al. 2008). In Langzeitstudien wurde innerhalb einer Viruspopulation in der frühen Phase der HCV-Infektion aufgrund unterschiedlicher „*Bottleneck*“-Ereignisse die Virusdiversität in den Patienten merkbar reduziert (Bull et al. 2011). Dies könnte

erklären, warum in den Patienten nach 30 Jahren nur noch eine der drei Varianten gefunden wurde.

Um die evolutionäre Entwicklung der Anti-D Kohorte innerhalb der letzten 30 Jahre genauer zu untersuchen, wurden die Patienten-Sequenzen und die klonalen Sequenzen der Infektionsquelle in die drei Gruppen unterteilt und jeweils mit einer Konsensussequenz des GT 1b verglichen. Aufgrund des 30 Jahre alten Probenmaterials der Immunglobuline war es trotz sensitiver PCR-Methoden nicht möglich, die Genregion für die Nicht-Strukturproteine NS4A und NS4B zu amplifizieren. Daher beschränkt sich die Evolutionsanalyse auf den Sequenzbereich des NS3-Proteins. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass im Laufe der 30 Jahre in NS3 nur wenige Mutationen im Sinne einer Reversion zur allgemeinen GT 1b Konsensussequenz zu beobachten waren. Die Abweichungen in der Infektionsquelle von der allgemeinen GT 1b Konsensussequenz waren in den meisten Patientensequenzen auch nach 30 Jahren noch präsent (Tabelle 3.1) Dies war überraschend, denn einige Polymorphismen aus den Infektionsquelle der Anti-D Kohorte sind nahezu einzigartig in Genotyp 1b Isolaten und man hätte erwartet, dass diese zurück zur Konsensus-Aminosäure mutieren. Die Substitution K1406Q ist z.B. in einem häufigen HLA-A*02-restringierten CD8-Epitop einzigartig in der Anti-D Kohorte. Bei Testungen der Mutation in einem GT 1b Replikon, wurde die virale Fitness deutlich reduziert (unveröffentlichte Daten). Trotzdem ist die Substitution weitgehend stabil in der Anti-D Kohorte und damit ein Indiz dafür, dass die individuelle Fitness von einzelnen Mutationen in unterschiedlichen Isolaten sehr verschieden sein kann. Die Substitution kommt auch konsequent in Abwesenheit des HLA-A*02-Allels vor. Da nicht alle genomischen Abschnitte erfolgreich aus der Infektionsquelle sequenziert werden konnten, war es für die weitere Arbeit wichtig, ob die Konsensussequenz der Patientenisolat als Surrogat für die Infektionsquelle in den folgenden Untersuchungen genutzt werden konnten. Die ausgeprägte Konservierung zumindest bei dem Vergleich der Infektionsquelle mit der Konsensussequenz aus den Patienten zeigte, dass dies zulässig ist und die weiteren Ergebnisse nur minimal beeinflusst hat. Ähnliche Untersuchungen wurden in der Irischen Anti-D Kohorte durchgeführt. Allerdings wurden in diesen Studien auch die Reversionen in Abwesenheit des Immundrucks hervorgehoben (Ray et al. 2005; Merani et al. 2011). Der Einfluss der individuellen Mutationen auf die virale Fitness ist demzufolge stark abhängig von dem sequenziellen Hintergrund der Infektionsquelle.

Die Variabilität zwischen den Genotypen aber auch innerhalb eines Genotyps mit den unterschiedlichen HCV-Varianten spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Vakzinen.

Ein wichtiger Aspekt in dieser Arbeit war die Charakterisierung der Virusevolution in den Nicht-Strukturproteinen über einen langen Zeitraum einer chronischen HCV-Infektion. Hierzu wurde die Rate der synonymen und nicht-synonymen Mutationen innerhalb der Nicht-Strukturproteine NS3 bis NS5B als Vergleich zwischen den einzelnen Patientensequenzen und der gruppenspezifischen Konsensussequenz untersucht. Im Vergleich zu den Proteinen NS3/4A, NS4B und NS5B konnten die nicht-synonymen Mutationen in dem NS5A-Protein häufiger beobachtet werden. (Abbildung 3.4) Dies bedeutet, dass entweder ein größerer Selektionsdruck auf dem NS5A-Protein liegt oder in diesem Protein die negative Selektion weniger ausgeprägt ist. Mit negativer Selektion ist die Notwendigkeit gemeint, eine bestimmte Sequenz zur Erhaltung der Proteinfunktion zu selektieren. Die Funktion von NS5A im viralen Replikationszyklus ist nicht abschließend geklärt, allerdings scheinen regulatorische Funktionen durch Interaktion mit verschiedenen Wirtsproteinen im Vordergrund zu stehen (Shirota et al. 2002; Gosert et al. 2003). Da keine Struktur oder enzymatische Funktion beschrieben ist, mag die negative Selektion weniger ausgeprägt sein.

Erhöhte positive Selektion wäre z.B. durch größeren Immunselektionsdruck denkbar. In den Nicht-Strukturproteinen kommt da vor allem der Selektionsdruck durch CD8⁺ T-Zellen in Frage. Für eine entsprechende Analyse muss die Häufigkeit der unterschiedlichen Mutationen innerhalb und außerhalb spezifischer CD8-Epitope untersucht werden. In dieser Untersuchung zeigte sich, dass im Gegensatz zu den synonymen Mutationen die nicht-synonymen Mutationen häufiger innerhalb der CD8-Epitope als außerhalb nachgewiesen wurden (Abbildung 3.8). Innerhalb der CD8-Epitope wurden 30 % der Mutationen in NS3/4A und 19 % der Mutationen in NS5B lokalisiert. Bei erhöhten Raten von nicht-synonymen Mutationen in NS5A handelte es sich offenbar nicht um vermehrten CD8⁺ T-Zell-Selektionsdruck, da innerhalb und außerhalb der CD8-Epitope die Verteilung der Mutationen keinen signifikanten Unterschied aufwies. Auch in NS4B wurden die nicht-synonymen Mutationen häufiger innerhalb publizierter CD8-Epitope nachgewiesen, allerdings war in diesem Protein der Unterschied statistisch nicht signifikant. Der Grund könnte

die niedrige Anzahl an publizierten CD8-Epitopen in dem NS4B-Protein sein (<http://hcv.lanl.gov/>). Diese Analyse basiert auf den bisher publizierten CD8-Epitopen. Natürlich ist diese Liste nicht vollständig und in aktuellen Epitop-Kartierungs-Studien werden kontinuierlich neue CD8-Epitope gefunden (Neumann-Haefelin et al. 2008). Damit könnte die tatsächliche Frequenz der Mutationen innerhalb von CD8-Epitopen deutlich höher sein. Auch in Langzeitstudien von Patienten mit einer akuten HCV-Infektion konnte beobachtet werden, dass Mutationen vermehrt in CD8-Epitopen auftreten (Cox 2005; Kuntzen et al. 2007). Zusammengefasst wurde nachgewiesen, dass die nicht-synonymen Mutationen häufiger innerhalb von CD8-Epitopen vorkommen als außerhalb. Es wurde bestätigt, dass der starke Selektionsdruck der CD8⁺ T-Zellen einen entscheidenden Einfluss auf die Evolution des Hepatitis C Virus in den Nicht-Strukturproteinen hat.

Basierend auf diesen Daten, wurden die Regionen außerhalb der beschriebenen CD8-Epitope eingehender auf Polymorphismen untersucht, die durch reproduzierbaren Selektionsdruck entstanden sind. Dabei wurde überprüft, ob die Polymorphismen mit der Expression eines spezifischen HLA-Allels assoziiert sind (Tabelle 3.2). Anhand dieser umfangreichen Sequenzanalyse konnten sechs neue potentielle CD8-Epitope identifiziert werden. Der funktionelle Nachweis der neuen CD8-Epitope erfolgte in Probenmaterial von intravenös drogenabhängigen Patienten, die eine spontane Ausheilung der HCV-Infektion aufwiesen (Abbildung 3.10). Interessanterweise wurden in dieser Studie häufiger Selektion in HLA-B-Allel-restriktiven CD8-Epitopen entdeckt (Abbildung 3.12). Auch in Studien mit HIV-1-Infektionen wurde die Dominanz des Selektionsdrucks durch HLA-B-Allele beschrieben (Kiepiela et al. 2004). Mutationen, die reproduzierbar in CD8⁺ T-Zellepitopen auftreten, deuten darauf hin, dass die entsprechende CD8⁺ T-Zellantwort funktionell bedeutsam ist und tatsächlich einen Selektionsdruck aufbaut. Somit ist diese Art der Sequenzanalyse eine gute Alternative, um unbekannte HCV-spezifische CD8-Epitope zu kartieren. Die meisten Studien verwenden zur Epitopkartierung die GT 1a Sequenz H77. Anhand überlappender Peptide werden die Zielregionen auf mögliche Epitope überprüft (Lauer et al. 2002; Zur Schulze Wiesch et al. 2007). Dabei ist zu beachten, dass die GT-spezifischen Sequenzunterschiede eine entschiedene Rolle bei der antiviralen Immunantwort gegen HCV spielen (Giugliano et al. 2009). Detaillierte Epitopkarten sind hilfreich für zukünftige Therapieansätze und die Vakzinentwicklung.

4.2 Der Einfluss der „*Escape*“-Mutationen auf die virale Fitness des Hepatitis C Virus

Die Bedeutung von „*Escape*“-Mutationen in Zielepitopen der CD8⁺ T-Zellantwort für den Infektionsverlauf ist weitgehend unklar. In frühen Studien mit HIV-infizierten Patienten wurde gezeigt, dass „*Escape*“-Mutationen in immundominanten CD8⁺ T-Zell-Epitopen mit dem Verlust der Immunkontrolle assoziiert sind (Goulder et al. 1997; Feeney et al. 2004). Allerdings zeigen jüngere Studien, dass Mutationen wiederholt in Zielepitopen selektiert werden, die durch „protektive“ HLA-Allele wie HLA-B*27 und HLA-B*57 präsentiert werden (Miura et al. 2009; Miura et al. 2010). Diese Allele sind mit einem günstigen Verlauf der HIV-Erkrankung assoziiert. Die immundominanten Epitope für diese protektiven Allele liegen in dem konservierten HIVgag Protein und es konnte gezeigt werden, dass die selektierten „*Escape*“-Mutationen mit hohen Fitnesskosten assoziiert sind. Möglicherweise sind sogar diese hohen Fitnesskosten für das Virus verbunden mit einer niedrigen Replikationsrate die Ursache des protektiven Effekts. Das bedeutet, dass eine hohe genetische Barriere für „*Escape*“-Mutationen möglicherweise günstig ist. Auch für HCV konnte in Studien belegt werden, dass einige „*Escape*“-Mutationen mit einem hohen Verlust der viralen Fitness assoziiert sind, so dass die Plastizität des Genoms durch funktionelle Zwänge eingeschränkt wird (Soderholm et al. 2006; Neumann-Haefelin et al. 2007)(Salloum et al. 2008) (Uebelhoer et al. 2008; Prado et al. 2010). Ein wichtiger Aspekt ist, ob die reduzierte Fitness durch sekundäre Mutationen kompensiert werden kann.

In den HLA-B*15-restringierten Epitopen LLRHHNMVY_{2450–2458} und SQRQKKVTF_{2466–2674} werden reproduzierbar „*Escape*“-Mutationen selektiert (Abbildung 3.11). Eine zusätzliche Ko-Variationsanalyse an GT 1b Sequenzen aus der HCV-Datenbank in Kooperation mit der Bioinformatik der Universität Duisburg-Essen konnte belegen, dass die Substitutionen an H2454R und K2440Q/S/A sowie S2439T/A und M2456L signifikant miteinander assoziiert sind (Ruhl et al. 2011 b). In dieser Studie wurde verdeutlicht, dass durch die sekundären Mutationen außerhalb des Epitops die Fitnesskosten durch die primären „*Escape*“-Mutationen kompensiert werden. Basierend auf den Sequenzanalysen wurde ein Zusammenhang zwischen den Sequenzpolymorphismen in der C-terminalen Region und der „*Escape*“-Mutationen des HLA-B*15-Epitops

LLRHHNMVY_{2450–2458} deutlich. In einer dreidimensionalen Struktur des NS5B-Proteins liegt die Substitution K2440Q/A/S in enger räumlicher Nähe zu der „Escape“-Mutation H2454R (Abbildung 3.14). Die Mutation nach Arginin verändert die elektronische Ladung und erhöht in diesem Bereich die positive Ladung. Die beobachteten Substitutionen entfernen an Position 2440 die positive Ladung, sodass die Stabilität der Nettoladung möglicherweise für die Funktion des Proteins notwendig ist. Das NS5B-Protein kodiert das Gen für die RNA-abhängige RNA-Polymerase und ist ein hoch konserviertes HCV-Protein. Veränderungen der konservierten Proteinstruktur könnten einen enormen Einfluss auf den Replikationsablauf ausüben (Lesburg et al. 1999). Die Auswirkungen der kompensatorischen Mutationen auf die virale Fitness wurden mit Hilfe des subgenomischen Replikons Con1 untersucht. Dabei handelt es sich um ein Replikonsystem mit einem GT 1b spezifischen Hintergrund, das für funktionelle Analysen der Replikation geeignet ist (Lohmann et al. 2003). Tatsächlich zeigte sich dabei, dass die Virusreplikation durch die H2454R-Mutation deutlich beeinträchtigt ist. Die Kombination mit der sekundären Substitution K2440Q in der C-terminalen Region des HLA-B*15-Epitops und der „Escape“-Mutation H2454R innerhalb des CD8-Epitops konnte das Replikationsniveau wieder deutlich erhöhen, obwohl nicht ganz das Niveau des Prototyps erreicht wurde (Abbildung 3.15). In aktuellen Arbeiten wurde die Anpassung des Virus an den Immundruck und die daraus resultierende Balance zwischen Fitness und „Escape“-Mutationen mehrfach für die in HCV protektiven HLA-Allelen wie HLA-A*03, HLA-B*27 und HLA-B*57 untersucht. Diese Allele sind mit einer spontanen Ausheilung der HCV-Infektion assoziiert (McKiernan et al. 2004; Thio et al. 2002; Kim et al. 2011; Merani et al. 2011). In diesen Studien wird hervorgehoben, dass für erfolgreichen „Escape“ die Selektion von komplexen Mutationsmustern notwendig ist. Für das immundominante CD8-Epitop des HLA-B*27-Allels sind z.B. mindestens 2 bis 3 Substitutionen notwendig, um die Funktionalität der CD8⁺ T-Zellantwort zu unterbinden. Allerdings wurde für keinen der Polymorphismen ein kompensatorischer Effekt nachgewiesen (Dazert et al. 2009). In einer Studie, in denen „Escape“-Mutationen, die wiederholt in einem immundominanten CD8-Epitop des protektiven HLA-A*03-Allels selektiert wurden, konnten kompensatorische Mechanismen belegt werden. Hier lag die kompensatorische Substitution ebenfalls im CD8-Epitop direkt neben der primären „Escape“-Mutation (Fitzmaurice et al. 2011). In einer weiteren Studie, wurden die

Auswirkungen von „*Escape*“-Mutationen in einem HLA-B57-spezifischen CD8-Epitop untersucht. Hier wurde eine kompensatorische Substitution, drei Aminosäuren von der primären „*Escape*“-Mutation entfernt, außerhalb des immundominanten CD8-Epitops nachgewiesen (Oniangue-Ndza et al. 2011). Dies bedeutet, dass für effektiven „*Escape*“ in allen drei immundominanten Epitopen dieser protektiven Allele eine hohe genetische Barriere überwunden werden muss. Das könnte bedeuten, dass die Immunkontrolle der CD8⁺ T-Zellen über die HCV-Infektion generell mit einer hohen genetischen Barriere zum „*Escape*“ assoziiert ist. Es stellt sich nun die Frage, welche Rolle das HLA-B*15-Allel bei Krankheitsverläufen spielt. Im Gegensatz dazu konnte eine große Studie zeigen, dass das HLA-B*15-Allel bei Patienten mit HCV-Infektion vor Lebertransplantation unterrepräsentiert war (Hraber et al. 2007). Die Daten wurden als protektiver Effekt für den Serotyp HLA-B*15(62) interpretiert. Bei einer HIV-Studie wurde die CD8⁺ T-Zellantwort seltener subdominanter HLA-Allele wie HLA-B*1503 untersucht (Frahm et al. 2006). Dabei konnte *in vitro* die erhöhte HLA-Allel-Frequenz mit der Viruskontrolle in Zusammenhang gebracht werden. Allerdings konnte unsere eigene Untersuchung zum Einfluss von HLA-B*15 auf den Infektionsverlauf in der Anti-D Kohorte keinen Zusammenhang zwischen einer spontanen Ausheilung der HCV-Infektion und dem HLA-B*15-Allel nachweisen. Möglicherweise ist die Notwendigkeit komplexer Mutationsmuster auf dem Weg zum „*Escape*“ z.B. im Rahmen von kompensatorischen Mutationen zwar tendenziell günstig, allerdings nicht ausreichend für einen protektiven Effekt. Andere Faktoren, wie z.B. das individuelle T-Zell-Rezeptorrepertoire und die Frage der Kreuzerkennung verschiedener Epitopvarianten, mögen eine zusätzliche Rolle spielen (Clute et al. 2005).

4.3 Die Auswirkung von Substitutionen auf spezifische CD8-Epitope und die Antigen-Prozessierung

Die Interaktion zwischen Wirt und Virus ist somit abhängig von der spezifischen Sequenz des Pathogens. Neben dem direkten Einfluss auf die Bindung zu HLA-Allel oder der Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor spielt die Sequenz aber auch eine wesentliche Rolle bei der Epitop-Prozessierung. Durch Polymorphismen außerhalb der HLA-Epitope können wichtige Schritte in der Prozessierung beeinträchtigt werden und damit die Präsentation des Antigens an der Zelloberfläche verhindern (Bowen und Walker 2005). Mutationen, die in flankierenden Epitopregionen die

Antigen-Prozessierung blockieren, sind schon in HIV-1-Studien beschrieben worden (Allen et al. 2004; Draenert et al. 2004; Milicic et al. 2005). Auch für HCV wurde ein Polymorphismus neben dem C-terminalen Ende eines HLA-A*02-Epitops in NS3 beschrieben, der die Prozessierung des Epitops blockiert (Seifert et al. 2004). In der aktuellen Studie ist die sekundäre Mutation in der N-terminalen flankierenden Region 17 Aminosäuren von der primären „Escape“-Mutation im HLA-B*15-Epitop entfernt. Unsere Daten sprechen dafür, dass es sich um eine kompensatorische Mutation handelt. Allerdings wäre es auch denkbar, dass die Mutation in HLA-B*15-positive Patienten selektiert wird, weil sie die Prozessierung des Antigens blockiert. Die relativ große Distanz zum Epitop wäre für eine Mutation, die Antigen-Prozessierung blockiert, ungewöhnlich.

Typischerweise wird der Einfluss von Substitutionen im Epitop auf die HLA-Bindung und Funktion von T-Zellen mit Hilfe von synthetischen Peptiden untersucht. Da hierbei keine endogene Prozessierung des Antigens notwendig ist, kann der Einfluss von Substitutionen in der flankierenden Region des Epitops nicht untersucht werden. Alternativ ist es möglich, einzelne Schritte der Prozessierung direkt zu messen (Le Gall et al. 2007). So können die Spaltprodukte des Immunproteasoms, die Transportrate dieser Produkte in das ER über das TAP-Protein (*transporter associated with processing*) und auch die weitere Prozessierung durch ER-ständige Peptidasen bestimmt werden. Allerdings sind diese Untersuchungen technisch aufwändig. Das Ziel war es daher, ein relativ einfaches und leicht zu modifizierendes System zu entwickeln, mit dem die Erkennung endogen prozessierter Antigene untersucht werden kann. Dies sollte durch ein Ko-Kultur-Zellsystem erreicht werden, welches die reguläre Situation zwischen Antigen-präsentierender Zelle und Effektorzelle widerspiegelt. Die Zielzellen sollten in der Lage sein, das Zielpeptid auf dem MHC-Klasse-I Molekül zu präsentieren. Zur Etablierung des Systems wurde ein DNA-Vektor generiert, in dem ein Fusionsprotein aus einem Kontrollepitop aus Influenza A (GILGFVFTL_{58–66}) zusammen mit einer Region aus HCV-NS3 mit mehreren immundominanten Epitopen gefolgt von GFP exprimiert wird. Die Verwendung von PBMCs als Zielzellen hat den entscheidenden Vorteil, dass diese nicht auf einen HLA-Typ begrenzt sind, was bei Zelllinien (wie z.B. der Hepatomazelllinie HepG2) der Fall wäre. Darüber hinaus ist bei vielen Tumorzelllinien die HLA-Expression herunterreguliert. Durch Nutzung von PBMCs kann das System auf Epitope für jedes HLA-Allel angewendet werden, solange

PBMCs des entsprechenden Allels verfügbar sind. Der Vektor kann beliebig modifiziert werden, indem z.B. einzelne Substitutionen hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Antigenprozessierung getestet werden. Mit Hilfe des GFP kann über die Analyse am FACS die Effizienz der Transfektion kontrolliert werden (Abbildung 3.17). Als Effektorzellen wurden zunächst CD8⁺ T-Zellen spezifisch für das Kontroll-Epitop GILGFVFTL_{58–66} von gesunden Spendern expandiert. Durch die IFN- γ -Produktion der aktivierten Effektorzellen wurde nachgewiesen, dass die Zielzellen in der Lage waren, das Epitop aus dem Fusionsprotein zu prozessieren und im Komplex mit HLA-A*02 zu präsentieren. (Abbildung 3.18).

Zukünftig soll nun mit Hilfe des etablierten Systems der Einfluss von Sequenzvariationen auf die Antigen-Präsentation gezielt untersucht werden. So kann zum Beispiel die Bedeutung der Mutationen in der flankierenden Region des HLA-B*15-Epitops eingehender untersucht werden. Eine wichtige Fragestellung für zukünftige Arbeiten ist außerdem, ob die Effizienz der Prozessierung von Epitopen Einfluss auf die Immundominanz hat.

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsch

In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen der zellulären Immunantwort und der Evolution des Hepatitis C Virus untersucht. Zum einen wurde die Abhängigkeit der Virusevolution von der HLA-Klasse I-Ausstattung untersucht und die immunologischen Auswirkungen von Mutationen in CD8⁺ T-Zell-Epitopen charakterisiert. Zum anderen wurde die Bedeutung von Mutationen in Zielepitopen von CD8⁺ T-Zellen für die virale Fitness untersucht. Schließlich wurde ein experimentelles System etabliert, mit dem man die Auswirkungen von Sequenzunterschieden auf die Präsentation von endogen prozessierten Antigenen bestimmen kann.

Grundlage für diese Untersuchungen ist eine Kohorte von 2867 Patientinnen, die 1977/78 durch kontaminierte Anti-D Immunglobuline in einem großen Ausbruch infiziert worden ist. Da der Infektionszeitpunkt und die Virussequenz der Infektionsquelle bekannt sind, konnte die Virusevolution nach 30 Jahren detailliert untersucht werden.

Im ersten Teil des Projekts wurden 78 HCV-Sequenzen der Patienten und klonale Sequenzen der Infektionsquelle erstellt und ihre phylogenetische Zugehörigkeit überprüft. Anhand der phylogenetischen Analysen der einzelnen nicht-strukturellen Proteine NS3 bis NS5B konnte die engere Verwandtschaft der Virussequenzen aus den Anti-D Patienten im Vergleich zu Sequenzen aus der HCV-Datenbank hervorgehoben werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die klonalen Sequenzen der Infektionsquelle und die Sequenzen der Anti-D Patienten drei separate phylogenetische Gruppen ausbilden. Dieses Ergebnis bestätigt, dass mindestens drei verwandte HCV-Varianten in den kontaminierten Immunglobulin-Chargen präsent waren. Des Weiteren wurden die Mutationsrate und deren Abhängigkeit von der HLA-Klasse I-Ausstattung charakterisiert. Die individuelle HLA-Klasse I-Ausstattung der Patienten bestimmt, welche Epitope den CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden können. Dabei wurde nachgewiesen, dass die Häufigkeit von Aminosäure-Substitutionen innerhalb vorbeschriebener CD8-Epitope signifikant höher ist als außerhalb. Der Einfluss der Mutationen auf die Erkennung durch CD8⁺ T-Zellen wurde in ausgewählten Epitopen untersucht und bestätigte,

dass die varianten Peptide schlechter erkannt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen einer erhöhten Mutationsrate in CD8-Epitopen wurde getestet, ob sich durch Analyse der Virusevolution neue CD8-Epitope identifizieren lassen. Durch eine statistische Analyse konnten so Kandidaten für neue Epitope identifiziert werden, von denen sechs experimentell bestätigt wurden. Insgesamt war der durch das adaptive Immunsystem hervorgerufene Selektionsdruck dominiert durch HLA-B-restringierte CD8⁺ T-Zellen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass der Selektionsdruck der CD8⁺ T-Zellen einen wesentlichen Einfluss auf die Evolution des Hepatitis C Virus in den Nicht-Strukturproteinen hat, indem sich das Virus an den Immundruck anpasst.

Im zweiten Teil des Projekts wurde der Einfluss von „*Escape*“-Mutationen auf die virale Fitness untersucht werden. Ein wichtiger Aspekt war dabei, ob es zu Kompensationsmechanismen kommt, wenn durch Substitutionen die virale Fitness beeinträchtigt ist. Basierend auf den Sequenzanalysen wurde ein Zusammenhang zwischen „*Escape*“-Mutationen in einem Epitop und Substitutionen in der N-terminalen Region des Epitops gefunden. Diese Substitutionen wurden in einem Replikationsmodell für HCV (Con1 Replikon) getestet. Tatsächlich zeigten die Ergebnisse, dass durch die primäre „*Escape*“-Mutation die virale Fitness deutlich reduziert wurde und durch die zweite Mutation außerhalb des Epitops wieder hergestellt wurde.

Welchen Einfluss Sequenzunterschiede auf die Prozessierung des viralen Antigens haben ist weitgehend unklar, da in der Regel für die funktionellen Analysen synthetische Peptide genutzt werden. Dabei wird jedoch nicht die endogene Prozessierung des viralen Antigens mit einbezogen. In diesem Teil des Projekts wurde ein System etabliert, das die endogene Prozessierung des Antigens erlaubt. Dazu wurden periphere mononukleäre Zellen des Blutes (PBMCs) als Zielzellen mit einem Vektor transfiziert, der für das Epitop zusammen mit der flankierenden Region kodiert. Über eine Fusion der Sequenz mit GFP kann die Transfektionseffizienz kontrolliert werden. Diese Zielzellen wurden zusammen mit CD8⁺ T-Zellen, die für das Epitop spezifisch sind kultiviert und mit Hilfe der intrazellulären Zytokin-Färbung für Interferon gamma (IFN- γ) getestet, ob das Antigen tatsächlich präsentiert wird. Mit Hilfe dieses Systems soll in zukünftigen Experimenten der Einfluss von Sequenzvariationen in HCV auf die Antigen-Präsentation untersucht werden.

5.2 Englisch

In the present study the interaction between the adaptive cellular immune response and the evolution of the hepatitis C virus was analyzed in great detail. In the first part the impact of HLA-class-I associated selection pressure on viral evolution and influence of mutations in epitopes on recognition by CD8⁺ T-cell was characterized. Next the consequences of escape mutations on viral fitness were determined. Finally, an experimental system was established that allows analysis of the impact of viral sequence polymorphisms on presentation of the endogenously processed antigen.

This project was based on a common HCV genotype (GT) 1b outbreak that occurred after inoculation of contaminated anti-D immunoglobulin to women in 1977/78. This East-German anti-D cohort represents a unique HCV cohort, because sequence heterogeneity of the inoculum and most transmission factors are known and well controlled.

Phylogenetic analysis of 78 viral sequences from patients of the Anti-D cohort spanning the complete NS3 to NS5B supported a clade independent of unrelated HCV sequences from the database confirming the smaller genetic distance of sequences from the outbreak. Interestingly, the analysis also revealed existence of at least three different clusters within the anti-D cohort. Founders of each cluster were found to be already present in the infection source, suggesting the presence of three different virus variants in the infection source. In this cohort the influence of HLA-class I-associated selection pressure on virus evolution was characterized. The HLA-class I genotype determines the epitope repertoire that can be presented to CD8⁺ T-cells. The analysis revealed that amino substitutions are significantly more frequent inside previously described CD8⁺ T-cell epitopes compared to the regions outside. Additional experiments that addressed the impact of sequence variation on CD8⁺ T-cell recognition supported that the variant epitopes escape from the recognition by CD8⁺ T-cells. Base on the observation or enriched mutation rates inside previously described CD8 epitopes it was tested if novel epitopes can be detected by analysis of HCV evolution. Indeed, a number of candidate epitopes was identified by statistical analysis of HLA class I-associated viral sequence polymorphisms, six of which were experimentally confirmed. Overall selection of mutations was dominated by HLA-B-restricted CD8⁺ T-cell. These results strongly

support the dominant influence of CD8⁺ T-cell selection pressure on the evolution of HCV.

In the second part the influence of escape mutations on viral fitness was determined. One important aspect was whether compensatory evolution occurs when escape mutations inside CD8 epitopes are associated with fitness costs. Based on sequence analysis an association between a polymorphism in the epitope flanking region and the primary escape mutation inside an epitope was identified. These mutations were analyzed in a replication model for HCV (subgenomic replicon Con1). Indeed, replication was substantially impaired when the escape mutation was tested and was rescued when the second substitution in the epitope flanking region was added.

The impact of sequence variation in the epitope flanking region on the T-cell response is often unclear as most functional analysis relies on synthetic peptides. This approach does not include analyses of endogenously processed antigens. In this final part of this study, a system was established that allows for endogenous processing of the epitope. Therefore PBMC served as target cells after transfection with a vector coding for the epitope imbedded in the natural flanking region. Transfection efficiency was controlled by expression of GFP fused to the HCV sequence. Such target cells were incubated with CD8⁺ T-cells specific for the relevant epitope and by intracellular cytokine staining for IFN- γ it was tested if the antigen is indeed presented. With the help of this system future experiments are envisaged to analyze the impact of sequence variation on antigen presentation.

6 Literaturverzeichnis

Accapezzato, D.; Francavilla, V.; Paroli, M.; Casciaro, M.; Chircu, L. V.; Cividini, A.; Abrignani, S.; Mondelli, M. U.; Barnaba, V. (2004): Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. In: *J. Clin. Invest* 113 (7), S. 963–972.

Allen, T. M.; Altfeld, M.; Yu, X. G.; O'Sullivan, K. M.; Lichterfeld, M.; Le Gall, S.; John, M.; Mothe, B. R.; Lee, P. K.; Kalife, E. T.; Cohen, D. E.; Freedberg, K. A.; Strick, D. A.; Johnston, M. N.; Sette, A.; Rosenberg, E. S.; Mallal, S. A.; Goulder, P. J. R.; Brander, C.; Walker, B. D. (2004): Selection, transmission, and reversion of an antigen-processing cytotoxic T-lymphocyte escape mutation in human immunodeficiency virus type 1 infection. In: *J. Virol* 78 (13), S. 7069–7078.

Appel, N.; Schaller, T.; Penin, F.; Bartenschlager (2006): From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. In: *J Biol Chem* 281 (15), S. 9833–9836.

Bar, K. J.; Li, H.; Chamberland, A.; Tremblay, C.; Routy, J. P.; Grayson, T.; Sun, C.; Wang, S.; Learn, G. H.; Morgan, C. J.; Schumacher, J. E.; Haynes, B. F.; Keele, B. F.; Hahn, B. H.; Shaw, G. M. (2010): Wide variation in the multiplicity of HIV-1 infection among injection drug users. In: *J. Virol* 84 (12), S. 6241–6247.

Bartenschlager (2002): Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development. In: *Nat Rev Drug Discov* 1 (11), S. 911–916.

Bartenschlager; Ahlborn-Laake, L.; Mous, J.; Jacobsen, H. (1993): Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. In: *J Virol* 67 (7), S. 3835–3844.

Bartenschlager; Frese, M.; Pietschmann, T. (2004): Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. In: *Adv Virus Res* 63, S. 71–180.

Bartenschlager; Kaul, A.; Sparacio, S. (2003): Replication of the hepatitis C virus in cell culture. In: *Antiviral Res* 60 (2), S. 91–102.

Bartosch, B.; Vitelli, A.; Granier, C.; Goujon, C.; Dubuisson, J.; Pascale, S.; Scarselli, E.; Cortese, R.; Nicosia, A.; Cosset, F.-L. (2003b): Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. In: *J. Biol. Chem* 278 (43), S. 41624–41630.

Bendelac, A.; Lantz, O.; Quimby, M. E.; Yewdell, J. W.; Bennink, J. R.; Brutkiewicz, R. R. (1995): CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. In: *Science* 268 (5212), S. 863–865.

Bendelac, A.; Rivera, M. N.; Park, S. H.; Roark, J. H. (1997): Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. In: *Annu. Rev. Immunol* 15, S. 535–562.

Bensch B.; Seigel, B.; Ruhl, M.; Timm J.; Kuntz, M.; Blum, H. E.; Pircher, H.; Thimme, R.; Walker, C. M. (2010): Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on Exhausted HCV-Specific CD8+ T Cells Is Linked to Antigen Recognition and T Cell Differentiation. In: *PLoS Pathog* 6 (6), S. e1000947.

Benseler, V.; Schlitt, H. J. (2011): Die Leber als immunologisches Organ. In: *Z Gastroenterol* 49 (1), S. 54–62.

Bericht der Staatlichen Hygiene-Inspektion vom 26. November 1979, Ministerium für Gesundheitswesen der DDR. Deutsche Bundestag; Bundesdrucksache 13/2732 vom 24.10.1995. Bonn: Bundesanzeiger Verlagsgesellschaft.

Berman, K.; Kwo, P. Y. (2009): Boceprevir, an NS3 protease inhibitor of HCV. In: *Clin Liver Dis* 13 (3), S. 429–439.

Billerbeck, E.; Bottler, T.; Thimme, R. (2007): Regulatory T cells in viral hepatitis. In: *World J. Gastroenterol* 13 (36), S. 4858–4864.

Blackburn, S. D.; Shin, H.; Haining, W. N.; Zou, T.; Workman, C. J.; Polley, A.; Betts, M. R.; Freeman, G. J.; Vignali, D. A. A.; Wherry, E. J. (2009): Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. In: *Nat. Immunol* 10 (1), S. 29–37.

Blight, K. J.; Kolykhalov, A. A.; Rice, C. M. (2000): Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. In: *Science* 290 (5498), S. 1972–1974.

Bode, J. G.; Brenndörfer, E. D.; Häussinger, D. (2008): Hepatitis C virus (HCV) employs multiple strategies to subvert the host innate antiviral response. In: *Biol. Chem* 389 (10), S. 1283–1298.

Bode, J. G.; Ludwig, S.; Ehrhardt, C.; Albrecht, U.; Erhardt, A.; Schaper, F.; Heinrich, P. C.; Häussinger, D. (2003): IFN- α antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. In: *FASEB J* 17 (3), S. 488–490.

Boettler, T.; Spangenberg, H. C.; Neumann-Haefelin, C.; Panther, E.; Urbani, S.; Ferrari, C.; Blum, H. E.; Weizsäcker, F. von; Thimme, R. (2005): T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. In: *J. Virol* 79 (12), S. 7860–7867.

Boutwell, C. L.; Rolland, M. M.; Herbeck, J. T.; Mullins, J. I.; Allen, T. M. (2010): Viral evolution and escape during acute HIV-1 infection. In: *J. Infect. Dis* 202 Suppl 2, S. S309–14.

Bowen, D. G.; Walker, C. M. (2005): Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. In: *Nature* 436 (7053), S. 946–952.

Branch, A. D.; Stump, D. D.; Gutierrez, J. A.; Eng, F.; Walewski, J. L. (2005): The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. In: *Semin. Liver Dis* 25 (1), S. 105–117.

Brown, R. S. (2005): Hepatitis C and liver transplantation. In: *Nature* 436 (7053), S. 973–978.

Bull, R. A.; Luciani, F.; McElroy, K.; Gaudieri, S.; Pham, S. T.; Chopra, A.; Cameron, B.; Maher, L.; Dore, G. J.; White, P. A.; Lloyd, A. R.; Ou, J.-h. J. (2011): Sequential Bottlenecks Drive Viral Evolution in Early Acute Hepatitis C Virus Infection. In: *PLoS Pathog* 7 (9), S. e1002243.

- Cabrera, R.; Tu, Z.; Xu, Y.; Firpi, R. J.; Rosen, H. R.; Liu, C.; Nelson, D. R. (2004): An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. In: *Hepatology* 40 (5), S. 1062–1071.
- Cai, Z.; Zhang, C.; Chang, K.-S.; Jiang, J.; Ahn, B.-C.; Wakita, T.; Liang, T. J.; Luo, G. (2005): Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. In: *J. Virol* 79 (22), S. 13963–13973.
- Carrère-Kremer, S.; Montpellier-Pala, C.; Cocquerel, L.; Wychowski, C.; Penin, F.; Dubuisson, J. (2002): Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. In: *J. Virol* 76 (8), S. 3720–3730.
- Carrington, M.; O'Brien, S. J. (2003): The influence of HLA genotype on AIDS. In: *Annu. Rev. Med* 54, S. 535–551.
- Cheng, C. P.; Tsai, C. H. (1999): Structural and functional analysis of the 3' untranslated region of bamboo mosaic potexvirus genomic RNA. In: *J. Mol. Biol* 288 (4), S. 555–565.
- Chevaliez, S.; Bouvier-Alias, M.; Brillet, R.; Pawlotsky, J.-M.; Lindenbach, B. (2009): Hepatitis C Virus (HCV) Genotype 1 Subtype Identification in New HCV Drug Development and Future Clinical Practice. In: *PLoS ONE* 4 (12), S. e8209.
- Clute, S. C.; Watkin, L. B.; Cornberg, M.; Naumov, Y. N.; Sullivan, J. L.; Luzuriaga, K.; Welsh, R. M.; Selin, L. K. (2005): Cross-reactive influenza virus-specific CD8+ T cells contribute to lymphoproliferation in Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis. In: *J. Clin. Invest* 115 (12), S. 3602–3612.
- Cox, A. L. (2005): Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. In: *Journal of Experimental Medicine* 201 (11), S. 1741–1752.
- Cox, A. L.; Mosbruger, T.; Lauer, G. M.; Pardoll, D.; Thomas, D. L.; Ray, S. C. (2005a): Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. In: *Hepatology* 42 (1), S. 104–112.
- Cox, A. L.; Mosbruger, T.; Mao, Q.; Liu, Z.; Wang, X.-H.; Yang, H.-C.; Sidney, J.; Sette, A.; Pardoll, D.; Thomas, D. L.; Ray, S. C. (2005b): Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. In: *J. Exp. Med* 201 (11), S. 1741–1752.
- Dazert, E.; Neumann-Haefelin, C.; Bressanelli, S.; Fitzmaurice, K.; Kort, J.; Timm J.; McKiernan, S.; Kelleher, D.; Gruener, N.; Tavis, J. E.; Rosen, H. R.; Shaw, J.; Bowness, P.; Blum, H. E.; Klenerman, P.; Bartenschlager, Thimme, R. (2009): Loss of viral fitness and cross-recognition by CD8+ T cells limit HCV escape from a protective HLA-B27-restricted human immune response. In: *J Clin Invest* 119 (2), S. 376–386.
- Dittmann, S.; Roggendorf, M.; Dürkop, J.; Wiese, M.; Lorbeer, B.; Deinhardt, F. (1991): Long-term persistence of hepatitis C virus antibodies in a single source outbreak. In: *J. Hepatol* 13 (3), S. 323–327.
- Domingo, E.; Martin, V.; Perales, C.; Grande-Pérez, A.; García-Arriaza, J.; Arias, A. (2006): Viruses as quasispecies: biological implications. In: *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 299, S. 51–82.

- Draenert, R.; Le Gall, S.; Pfafferott, K. J.; Leslie, A. J.; Chetty, P.; Brander, C.; Holmes, E. C.; Chang, S.-C.; Feeney, M. E.; Addo, M. M.; Ruiz, L.; Ramduth, D.; Jeena, P.; Altfeld, M.; Thomas, S.; Tang, Y.; Verrill, C. L.; Dixon, C.; Prado, J. G.; Kiepiela, P.; Martinez-Picado, J.; Walker, B. D.; Goulder, P. J. R. (2004): Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection. In: *J. Exp. Med* 199 (7), S. 905–915.
- Drake, J. W.; Charlesworth, B.; Charlesworth, D.; Crow, J. F. (1998): Rates of spontaneous mutation. In: *Genetics* 148 (4), S. 1667–1686.
- Dubuisson, J.; Penin, F.; Moradpour, D. (2002): Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. In: *Trends Cell Biol* 12 (11), S. 517–523.
- Egger D. (2002): Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex.pdf. In: *JoV*.
- Elena, S. F.; Sanjuán, R. (2007): Virus Evolution: Insights from an Experimental Approach. In: *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst* 38 (1), S. 27–52.
- Evans, M. J.; Hahn, T. von; Tscherne, D. M.; Syder, A. J.; Panis, M.; Wölk, B.; Hatzioannou, T.; McKeating, J. A.; Bieniasz, P. D.; Rice, C. M. (2007): Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. In: *Nature* 446 (7137), S. 801–805.
- Evans, M. J.; Rice, C. M.; Goff, S. P. (2004): Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101 (35), S. 13038–13043.
- Farci, P.; Shimoda, A.; Coiana, A.; Diaz, G.; Peddis, G.; Melpolder, J. C.; Strazzer, A.; Chien, D. Y.; Munoz, S. J.; Balestrieri, A.; Purcell, R. H.; Alter, H. J. (2000): The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. In: *Science* 288 (5464), S. 339–344.
- Feeney, M. E.; Tang, Y.; Roosevelt, K. A.; Leslie, A. J.; McIntosh, K.; Karthas, N.; Walker, B. D.; Goulder, P. J. R. (2004): Immune escape precedes breakthrough human immunodeficiency virus type 1 viremia and broadening of the cytotoxic T-lymphocyte response in an HLA-B27-positive long-term-nonprogressing child. In: *J. Virol* 78 (16), S. 8927–8930.
- Fitzmaurice, K.; Petrovic, D.; Ramamurthy, N.; Simmons, R.; Merani, S.; Gaudieri, S.; Sims, S.; Dempsey, E.; Freitas, E.; Lea, S.; McKiernan, S.; Norris, S.; Long, A.; Kelleher, D.; Klennerman, P. (2011): Molecular footprints reveal the impact of the protective HLA-A*03 allele in hepatitis C virus infection. In: *Gut*.
- Foster, G. R.; Hézode, C.; Bronowicki, J.-P.; Carosi, G.; Weiland, O.; Verlinden, L.; van Heeswijk, R.; van Baelen, B.; Picchio, G.; Beumont, M. (2011): Telaprevir Alone or With Peginterferon and Ribavirin Reduces HCV RNA in Patients With Chronic Genotype 2 But Not Genotype 3 Infections. In: *Gastroenterology*.
- Frahm, N.; Kiepiela, P.; Adams, S.; Linde, C. H.; Hewitt, H. S.; Sango, K.; Feeney, M. E.; Addo, M. M.; Lichterfeld, M.; Lahaie, M. P.; Pae, E.; Wurcel, A. G.; Roach, T.; St John, M. A.; Altfeld, M.; Marincola, F. M.; Moore, C.; Mallal, S.; Carrington, M.; Heckerman, D.; Allen, T. M.; Mullins, J. I.; Korber, B. T.; Goulder, P. J. R.; Walker, B.

- D.; Brander, C. (2006): Control of human immunodeficiency virus replication by cytotoxic T lymphocytes targeting subdominant epitopes. In: *Nat. Immunol* 7 (2), S. 173–178.
- Francesco, R. de; Steinkühler, C. (2000): Structure and function of the hepatitis C virus NS3-NS4A serine proteinase. In: *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 242, S. 149–169.
- Gaudieri, S.; Rauch, A.; Park, L. P.; Freitas, E.; Herrmann, S.; Jeffrey, G.; Cheng, W.; Pfafferott, K.; Naidoo, K.; Chapman, R.; Battegay, M.; Weber, R.; Telenti, A.; Furrer, H.; James, I.; Lucas, M.; Mallal, S. A. (2006): Evidence of Viral Adaptation to HLA Class I-Restricted Immune Pressure in Chronic Hepatitis C Virus Infection. In: *Journal of Virology* 80 (22), S. 11094–11104.
- Giugliano, S.; Oezkan, F.; Bedrejowski, M.; Kudla, M.; Reiser, M.; Viazov S.; Scherbaum, N.; Roggendorf; Timm J. (2009): Degree of cross-genotype reactivity of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells directed against NS3. In: *Hepatology* 50 (3), S. 707–716.
- Gosert, R.; Egger, D.; Lohmann, V.; Bartenschlager; Blum, H. E.; Bienz, K.; Moradpour, D. (2003): Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. In: *J Virol* 77 (9), S. 5487–5492.
- Goulder, P. J.; Phillips, R. E.; Colbert, R. A.; McAdam, S.; Ogg, G.; Nowak, M. A.; Giangrande, P.; Luzzi, G.; Morgan, B.; Edwards, A.; McMichael, A. J.; Rowland-Jones, S. (1997): Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. In: *Nat. Med* 3 (2), S. 212–217.
- Grakoui, A.; Shoukry, N. H.; Woollard, D. J.; Han, J.-H.; Hanson, H. L.; Ghayeb, J.; Murthy, K. K.; Rice, C. M.; Walker, C. M. (2003): HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. In: *Science* 302 (5645), S. 659–662.
- Grakoui, A.; Wychowski, C.; Lin, C.; Feinstone, S. M.; Rice, C. M. (1993): Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. In: *J. Virol* 67 (3), S. 1385–1395.
- Guindon, S.; Dufayard, J.-F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. (2010): New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. In: *Syst. Biol* 59 (3), S. 307–321.
- Hahn & Liewehr; Liewehr, F. R. (2007): Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. In: *J Endod* 33 (7), S. 773–781.
- Hijikata, M.; Mizushima, H.; Akagi, T.; Mori, S.; Kakiuchi, N.; Kato, N.; Tanaka, T.; Kimura, K.; Shimotohno, K. (1993): Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. In: *J. Virol* 67 (8), S. 4665–4675.
- Holland, J.; Spindler, K.; Horodyski, F.; Grabau, E.; Nichol, S.; VandePol, S. (1982): Rapid evolution of RNA genomes. In: *Science* 215 (4540), S. 1577–1585.
- Hraber, P.; Kuiken, C.; Yusim, K. (2007): Evidence for human leukocyte antigen heterozygote advantage against hepatitis C virus infection. In: *Hepatology* 46 (6), S. 1713–1721.

- Hsu, M.; Zhang, J.; Flint, M.; Logvinoff, C.; Cheng-Mayer, C.; Rice, C. M.; McKeating, J. A. (2003): Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100 (12), S. 7271–7276.
- Janeway, Charles A. (2001): Immunobiology. The immune system in health and disease. 5. Aufl. New York NY u.a: Garland Publ. [u.a.].
- Kasprowicz, V.; Kang, Y.-H.; Lucas, M.; Zur Schulze Wiesch, J.; Kuntzen, T.; Fleming, V.; Nolan, B. E.; Longworth, S.; Berical, A.; Bengsch B.; Thimme, R.; Lewis-Ximenez, L.; Allen, T. M.; Kim, A. Y.; Klenerman, P.; Lauer, G. M. (2010): Hepatitis C Virus (HCV) Sequence Variation Induces an HCV-Specific T-Cell Phenotype Analogous to Spontaneous Resolution. In: *Journal of Virology* 84 (3), S. 1656–1663.
- Keele, B. F.; Giorgi, E. E.; Salazar-Gonzalez, J. F.; Decker, J. M.; Pham, K. T.; Salazar, M. G.; Sun, C.; Grayson, T.; Wang, S.; Li, H.; Wei, X.; Jiang, C.; Kirchherr, J. L.; Gao, F.; Anderson, J. A.; Ping, L.-H.; Swanstrom, R.; Tomaras, G. D.; Blattner, W. A.; Goepfert, P. A.; Kilby, J. M.; Saag, M. S.; Delwart, E. L.; Busch, M. P.; Cohen, M. S.; Montefiori, D. C.; Haynes, B. F.; Gaschen, B.; Athreya, G. S.; Lee, H. Y.; Wood, N.; Seoighe, C.; Perelson, A. S.; Bhattacharya, T.; Korber, B. T.; Hahn, B. H.; Shaw, G. M. (2008): Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105 (21), S. 7552–7557.
- Kenny-Walsh, E. (1999): Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. In: *N. Engl. J. Med* 340 (16), S. 1228–1233.
- Kiepiela, P.; Leslie, A. J.; Honeyborne, I.; Ramduth, D.; Thobakgale, C.; Chetty, S.; Rathnavalu, P.; Moore, C.; Pfafferott, K. J.; Hilton, L.; Zimbwa, P.; Moore, S.; Allen, T.; Brander, C.; Addo, M. M.; Altfeld, M.; James, I.; Mallal, S.; Bunce, M.; Barber, L. D.; Szinger, J.; Day, C.; Klenerman, P.; Mullins, J.; Korber, B.; Coovadia, H. M.; Walker, B. D.; Goulder, P. J. R. (2004): Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. In: *Nature* 432 (7018), S. 769–775.
- Kim, A. Y.; Kuntzen, T.; Timm J.; Nolan, B. E.; Baca, M. A.; Reyor, L. L.; Berical, A. C.; Feller, A. J.; Johnson, K. L.; Zur Schulze Wiesch, J.; Robbins, G. K.; Chung, R. T.; Walker, B. D.; Carrington, M.; Allen, T. M.; Lauer, G. M. (2011): Spontaneous control of HCV is associated with expression of HLA-B 57 and preservation of targeted epitopes. In: *Gastroenterology* 140 (2), S. 686-696.e1.
- Kloetzel, P. M. (2001): Antigen processing by the proteasome. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2 (3), S. 179–187.
- Koelle, K.; Cobey, S.; Grenfell, B.; Pascual, M. (2006): Epochal evolution shapes the phylodynamics of interpandemic influenza A (H3N2) in humans. In: *Science* 314 (5807), S. 1898–1903.
- Krieger, N.; Lohmann, V.; Bartenschlager (2001): Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. In: *J Virol* 75 (10), S. 4614–4624.
- Kuiken, C.; Hraber, P.; Thurmond, J.; Yusim, K. (2008): The hepatitis C sequence database in Los Alamos. In: *Nucleic Acids Res* 36 (Database issue), S. D512-6.

- Kuntzen, T.; Timm J.; Berical, A.; Lewis-Ximenez, L. L.; Jones, A.; Nolan, B.; Zur Schulze Wiesch, J.; Li, B.; Schneidewind, A.; Kim, A. Y.; Chung, R. T.; Lauer, G. M.; Allen, T. M. (2007): Viral Sequence Evolution in Acute Hepatitis C Virus Infection. In: *Journal of Virology* 81 (21), S. 11658–11668.
- Lauer, G. M.; Barnes, E.; Lucas, M.; Timm J.; Ouchi, K.; Kim, A. Y.; Day, C. L.; Robbins, G. K.; Casson, D. R.; Reiser, M.; Dusheiko, G.; Allen, T. M.; Chung, R. T.; Walker, B. D.; Klenerman, P. (2004): High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. In: *Gastroenterology* 127 (3), S. 924–936.
- Lauer, G. M.; Ouchi, K.; Chung, R. T.; Nguyen, T. N.; Day, C. L.; Purkis, D. R.; Reiser, M.; Kim, A. Y.; Lucas, M.; Klenerman, P.; Walker, B. D. (2002): Comprehensive analysis of CD8(+)-T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. In: *J. Virol* 76 (12), S. 6104–6113.
- Lauwerys, B. R.; Garot, N.; Renaud, J. C.; Houssiau, F. A. (2000): Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18. In: *J. Immunol* 165 (4), S. 1847–1853.
- Le Gall, S.; Stamegna, P.; Walker, B. D. (2007): Portable flanking sequences modulate CTL epitope processing. In: *J. Clin. Invest* 117 (11), S. 3563–3575.
- Lee, J.; Suh, W. I.; Shin, E.-C. (2010): T-cell dysfunction and inhibitory receptors in hepatitis C virus infection. In: *Immune Netw* 10 (4), S. 120–125.
- Lesburg, C. A.; Cable, M. B.; Ferrari, E.; Hong, Z.; Mannarino, A. F.; Weber, P. C. (1999): Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. In: *Nat. Struct. Biol* 6 (10), S. 937–943.
- Levy, S.; Todd, S. C.; Maecker, H. T. (1998): CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. In: *Annu. Rev. Immunol* 16, S. 89–109.
- Lin, W.; Kim, S. S.; Yeung, E.; Kamegaya, Y.; Blackard, J. T.; Kim, K. A.; Holtzman, M. J.; Chung, R. T. (2006): Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. In: *J. Virol* 80 (18), S. 9226–9235.
- Lindenbach, B. D.; Evans, M. J.; Syder, A. J.; Wölk, B.; Tellinghuisen, T. L.; Liu, C. C.; Maruyama, T.; Hynes, R. O.; Burton, D. R.; McKeating, J. A.; Rice, C. M. (2005): Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. In: *Science* 309 (5734), S. 623–626.
- Liu & Gale (2010): Hepatitis C Virus Evasion from RIG-I-Dependent Hepatic Innate Immunity. In: *Gastroenterol Res Pract* 2010, S. 548390.
- Lohmann, V.; Hoffmann, S.; Herian, U.; Penin, F.; Bartenschlager (2003): Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. In: *J Virol* 77 (5), S. 3007–3019.
- Lohmann, V.; Korner, F.; Koch, J.; Herian, U.; Theilmann, L.; Bartenschlager (1999a): Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. In: *Science* 285 (5424), S. 110–113.

- Lohmann, V.; Overton, H.; Bartenschlager (1999b): Selective stimulation of hepatitis C virus and pestivirus NS5B RNA polymerase activity by GTP. In: *J Biol Chem* 274 (16), S. 10807–10815.
- Manigold, T.; Shin, E.-C.; Mizukoshi, E.; Mihalik, K.; Murthy, K. K.; Rice, C. M.; Piccirillo, C. A.; Rehmann, B. (2006): Foxp3+CD4+CD25+ T cells control virus-specific memory T cells in chimpanzees that recovered from hepatitis C. In: *Blood* 107 (11), S. 4424–4432.
- McKiernan, S. M.; Hagan, R.; Curry, M.; McDonald, G. S. A.; Kelly, A.; Nolan, N.; Walsh, A.; Hegarty, J.; Lawlor, E.; Kelleher, D. (2004): Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. In: *Hepatology* 40 (1), S. 108–114.
- Merani, S.; Petrovic, D.; James, I.; Chopra, A.; Cooper, D.; Freitas, E.; Rauch, A.; Di Iulio, J.; John, M.; Lucas, M.; Fitzmaurice, K.; McKiernan, S.; Norris, S.; Kelleher, D.; Klenerman, P.; Gaudieri, S. (2011): Effect of immune pressure on hepatitis C virus evolution: insights from a single-source outbreak. In: *Hepatology* 53 (2), S. 396–405.
- Milicic, A.; Price, D. A.; Zimbwa, P.; Booth, B. L.; Brown, H. L.; Easterbrook, P. J.; Olsen, K.; Robinson, N.; Gileadi, U.; Sewell, A. K.; Cerundolo, V.; Phillips, R. E. (2005): CD8+ T cell epitope-flanking mutations disrupt proteasomal processing of HIV-1 Nef. In: *J. Immunol* 175 (7), S. 4618–4626.
- Miura, T.; Brockman, M. A.; Schneidewind, A.; Lobritz, M.; Pereyra, F.; Rathod, A.; Block, B. L.; Brumme, Z. L.; Brumme, C. J.; Baker, B.; Rothchild, A. C.; Li, B.; Trocha, A.; Cutrell, E.; Frahm, N.; Brander, C.; Toth, I.; Arts, E. J.; Allen, T. M.; Walker, B. D. (2009): HLA-B57/B*5801 human immunodeficiency virus type 1 elite controllers select for rare gag variants associated with reduced viral replication capacity and strong cytotoxic T-lymphocyte [corrected] recognition. In: *J. Virol* 83 (6), S. 2743–2755.
- Miura, T.; Brumme, Z. L.; Brockman, M. A.; Rosato, P.; Sela, J.; Brumme, C. J.; Pereyra, F.; Kaufmann, D. E.; Trocha, A.; Block, B. L.; Daar, E. S.; Connick, E.; Jessen, H.; Kelleher, A. D.; Rosenberg, E.; Markowitz, M.; Schafer, K.; Vaida, F.; Iwamoto, A.; Little, S.; Walker, B. D. (2010): Impaired replication capacity of acute/early viruses in persons who become HIV controllers. In: *J. Virol* 84 (15), S. 7581–7591.
- Münz, C.; Steinman, R. M.; Fujii, S.-i. (2005): Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. In: *J. Exp. Med* 202 (2), S. 203–207.
- Murphy, D. G.; Willems, B.; Deschenes, M.; Hilzenrat, N.; Mousseau, R.; Sabbah, S. (2007): Use of Sequence Analysis of the NS5B Region for Routine Genotyping of Hepatitis C Virus with Reference to C/E1 and 5' Untranslated Region Sequences. In: *Journal of Clinical Microbiology* 45 (4), S. 1102–1112.
- Nakabayashi, H.; Taketa, K.; Miyano, K.; Yamane, T.; Sato, J. (1982): Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. In: *Cancer Res* 42 (9), S. 3858–3863.
- Nakamoto, N.; Cho, H.; Shaked, A.; Olthoff, K.; Valiga, M. E.; Kaminski, M.; Gostick, E.; Price, D. A.; Freeman, G. J.; Wherry, E. J.; Chang, K.-M.; Gale, M. (2009):

Synergistic Reversal of Intrahepatic HCV-Specific CD8 T Cell Exhaustion by Combined PD-1/CTLA-4 Blockade. In: *PLoS Pathog* 5 (2), S. e1000313.

Nakamoto, N.; Kaplan, D. E.; Coleclough, J.; Li, Y.; Valiga, M. E.; Kaminski, M.; Shaked, A.; Olthoff, K.; Gostick, E.; Price, D. A.; Freeman, G. J.; Wherry, E. J.; Chang, K.-M. (2008): Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. In: *Gastroenterology* 134 (7), S. 1927-37, 1937.e1-2.

Neumann, A. U.; Lam, N. P.; Dahari, H.; Gretch, D. R.; Wiley, T. E.; Layden, T. J.; Perelson, A. S. (1998): Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. In: *Science* 282 (5386), S. 103–107.

Neumann-Haefelin, C.; Thimme, R. (2007): Impact of the genetic restriction of virus-specific T-cell responses in hepatitis C virus infection. In: *Genes Immun* 8 (3), S. 181–192.

Neumann-Haefelin, C.; Killinger, T.; Timm J.; Southwood, S.; McKinney, D.; Blum, H. E.; Thimme, R. (2007): Absence of viral escape within a frequently recognized HLA-A26-restricted CD8+ T-cell epitope targeting the functionally constrained hepatitis C virus NS5A/5B cleavage site. In: *J Gen Virol* 88 (Pt 7), S. 1986–1991.

Neumann-Haefelin, C.; Timm J.; Spangenberg, H. C.; Wischniowski, N.; Nazarova, N.; Kersting, N.; Roggendorf; Allen, T. M.; Blum, H. E.; Thimme, R. (2008): Virological and immunological determinants of intrahepatic virus-specific CD8+ T-cell failure in chronic hepatitis C virus infection. In: *Hepatology* 47 (6), S. 1824–1836.

Oniangue-Ndza, C.; Kuntzen, T.; Kemper, M.; Berical, A.; Wang, Y. E.; Neumann-Haefelin, C.; Foote, P. K.; Hills-Evans, K.; Reyor, L. L.; Kane, K.; Gladden, A. D.; Bloom, A. K.; Power, K. A.; Thimme, R.; Lauer, G. M.; Henn, M. R.; Kim, A. Y.; Allen, T. M. (2011): Compensatory Mutations Restore the Replication Defects Caused by CTL Escape Mutations in HCV Polymerase. In: *Journal of virology*.

Pereyra, F.; Jia, X.; McLaren, P. J.; Telenti, A.; Bakker, P. I. W. de; Walker, B. D.; Ripke, S.; Brumme, C. J.; Pulit, S. L.; Carrington, M.; Kadie, C. M.; Carlson, J. M.; Zhao, M. (2010): The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. In: *Science* 330 (6010), S. 1551–1557.

Perz, J. F.; Armstrong, G. L.; Farrington, L. A.; Hutin, Y. J. F.; Bell, B. P. (2006): The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. In: *J. Hepatol* 45 (4), S. 529–538.

Pestka, J. M.; Zeisel, M. B.; Bläser, E.; Schürmann, P.; Bartosch, B.; Cosset, F.-L.; Patel, A. H.; Meisel, H.; Baumert, J.; Viazov, S.; Rispeter, K.; Blum, H. E.; Roggendorf; Baumert, T. F. (2007): Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104 (14), S. 6025–6030.

Pietschmann, T.; Zayas, M.; Meuleman, P.; Long, G.; Appel, N.; Koutsoudakis, G.; Kallis, S.; Leroux-Roels, G.; Lohmann, V.; Bartenschlager, R. (2009): Production of infectious genotype 1b virus particles in cell culture and impairment by replication enhancing mutations. In: *PLoS Pathog* 5 (6), S. e1000475.

- Pileri, P.; Uematsu, Y.; Campagnoli, S.; Galli, G.; Falugi, F.; Petracca, R.; Weiner, A. J.; Houghton, M.; Rosa, D.; Grandi, G.; Abrignani, S. (1998): Binding of hepatitis C virus to CD81. In: *Science* 282 (5390), S. 938–941.
- Ploss, A.; Evans, M. J.; Gaysinskaya, V. A.; Panis, M.; You, H.; Jong, Y. P. de; Rice, C. M. (2009): Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. In: *Nature* 457 (7231), S. 882–886.
- Prado, J. G.; Prendergast, A.; Thobakgale, C.; Molina, C.; Tudor-Williams, G.; Ndung'u, T.; Walker, B. D.; Goulder, P. (2010): Replicative capacity of human immunodeficiency virus type 1 transmitted from mother to child is associated with pediatric disease progression rate. In: *J. Virol* 84 (1), S. 492–502.
- Radziejewicz, H.; Ibegbu, C. C.; Hon, H.; Osborn, M. K.; Obideen, K.; Wehbi, M.; Freeman, G. J.; Lennox, J. L.; Workowski, K. A.; Hanson, H. L.; Grakoui, A. (2008): Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific effector CD8⁺ T cells undergo massive apoptosis in the peripheral blood during acute HCV infection and in the liver during the chronic phase of infection. In: *J. Virol* 82 (20), S. 9808–9822.
- Ray, S. C.; Fanning, L.; Wang, X.; Netski, D. M.; Kenny-Walsh, E.; Thomas, D. L. (2005): Divergent and convergent evolution after a common-source outbreak of hepatitis C virus. In: *Journal of Experimental Medicine* 201 (11), S. 1753–1759.
- Rehermann, B. (2009): Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. In: *J Clin Invest* July, 2009 (Vol 119).
- Rispeter, K.; Lu, M.; Behrens, S. E.; Fumiko, C.; Yoshida, T.; Roggendorf, M. (2000): Hepatitis C virus variability: sequence analysis of an isolate after 10 years of chronic infection. In: *Virus Genes* 21 (3), S. 179–188.
- Roccasecca, R.; Ansuini, H.; Vitelli, A.; Meola, A.; Scarselli, E.; Acali, S.; Pezzanera, M.; Ercole, B. B.; McKeating, J.; Yagnik, A.; Lahm, A.; Tramontano, A.; Cortese, R.; Nicosia, A. (2003): Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. In: *J. Virol* 77 (3), S. 1856–1867.
- Rock, K. L.; Farfán-Arribas, D. J.; Shen, L. (2010): Proteases in MHC class I presentation and cross-presentation. In: *J. Immunol* 184 (1), S. 9–15.
- Rothbard J.B.; Taylor, W. R. (1988): A sequence pattern common to T cell epitopes. In: *EMBO J* 7 (1), S. 93–100.
- Ruhl, M.; Chhatwal, P.; Strathmann, H.; Kuntzen, T.; Bankwitz, D.; Skibbe, K.; Walker, A.; Heinemann, F. M.; Horn, P. A.; Allen, T. M.; Hoffmann, D.; Pietschmann, T.; Timm, J. (2011): Escape from a dominant HLA-B*15-restricted CD8⁺ T cell response against hepatitis C virus requires compensatory mutations outside the epitope. In: *Journal of virology*.
- Sabahi, A. (2009): Hepatitis C Virus entry: the early steps in the viral replication cycle. In: *Virol. J* 6, S. 117.
- Salloum, S.; Oniangue-Ndza, C.; Neumann-Haefelin, C.; Hudson, L.; Giugliano, S.; dem Siepen, M. aus; Nattermann, J.; Spengler, U.; Lauer, G. M.; Wiese, M.; Klenerman, P.; Bright, H.; Scherbaum, N.; Thimme, R.; Roggendorf; Viazov S.; Timm

J. (2008): Escape from HLA-B*08-restricted CD8 T cells by hepatitis C virus is associated with fitness costs. In: *J Virol* 82 (23), S. 11803–11812.

Santolini, E.; Pacini, L.; Fipaldini, C.; Migliaccio, G.; Monica, N. (1995): The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. In: *J. Virol* 69 (12), S. 7461–7471.

Seifert, U.; Liermann, H.; Racanelli, V.; Halenius, A.; Wiese, M.; Wedemeyer, H.; Ruppert, T.; Rispeter, K.; Henklein, P.; Sijts, A.; Hengel, H.; Kloetzel, P.-M.; Rehmann, B. (2004): Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. In: *J. Clin. Invest* 114 (2), S. 250–259.

Shankarappa, R.; Margolick, J. B.; Gange, S. J.; Rodrigo, A. G.; Upchurch, D.; Farzadegan, H.; Gupta, P.; Rinaldo, C. R.; Learn, G. H.; He, X.; Huang, X. L.; Mullins, J. I. (1999): Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. In: *J. Virol* 73 (12), S. 10489–10502.

Sheridan, I.; Pybus, O. G.; Holmes, E. C.; Klennerman, P. (2004): High-resolution phylogenetic analysis of hepatitis C virus adaptation and its relationship to disease progression. In: *J. Virol* 78 (7), S. 3447–3454.

Shimakami, T.; Hijikata, M.; Luo, H.; Ma, Y. Y.; Kaneko, S.; Shimotohno, K.; Murakami, S. (2004): Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. In: *J. Virol* 78 (6), S. 2738–2748.

Shirota, Y.; Luo, H.; Qin, W.; Kaneko, S.; Yamashita, T.; Kobayashi, K.; Murakami, S. (2002): Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. In: *J. Biol. Chem* 277 (13), S. 11149–11155.

Simmonds, P.; Bukh, J.; Combet, C.; Deléage, G.; Enomoto, N.; Feinstone, S.; Halfon, P.; Inchauspé, G.; Kuiken, C.; Maertens, G.; Mizokami, M.; Murphy, D. G.; Okamoto, H.; Pawlotsky, J.-M.; Penin, F.; Sablon, E.; Shin-I, T.; Stuyver, L. J.; Thiel, H.-J.; Viazov, S.; Weiner, A. J.; Widell, A. (2005): Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. In: *Hepatology* 42 (4), S. 962–973.

Sklan, E. H.; Charuwnon, P.; Pang, P. S.; Glenn, J. S. (2009): Mechanisms of HCV survival in the host. In: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6 (4), S. 217–227.

Soderholm, J.; Ahlen, G.; Kaul, A.; Frelin, L.; Alheim, M.; Barnfield, C.; Liljestrom, P.; Weiland, O.; Milich, D. R.; Bartenschlager, S.; Sallberg, M. (2006): Relation between viral fitness and immune escape within the hepatitis C virus protease. In: *Gut* 55 (2), S. 266–274.

Steinmann, E.; Penin, F.; Kallis, S.; Patel, A. H.; Bartenschlager, S.; Pietschmann, T. (2007): Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. In: *PLoS Pathog* 3 (7), S. e103.

Sugimoto, K.; Ikeda, F.; Stadanlick, J.; Nunes, F. A.; Alter, H. J.; Chang, K.-M. (2003): Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated in persistent HCV infection. In: *Hepatology* 38 (6), S. 1437–1448.

Team RDC: R: A language and environment for statistical computing. [<http://www.R-project.org>]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2004.

Tester, I.; Smyk-Pearson, S.; Wang, P.; Wertheimer, A.; Yao, E.; Tavis, J. E.; Rosen, H. R. (2005): Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. In: *Journal of Experimental Medicine* 201 (11), S. 1725–1731.

Thimme, R.; Opitz, O. G. (2007): Interleukin-10 and viral clearance: translation to viral hepatitis. In: *Gastroenterology* 132 (7), S. 2611–2613.

Thimme, R.; Bukh, J.; Spangenberg, H. C.; Wieland, S.; Pemberton, J.; Steiger, C.; Govindarajan, S.; Purcell, R. H.; Chisari, F. V. (2002): Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99 (24), S. 15661–15668.

Thimme, R.; Oldach, D.; Chang, K. M.; Steiger, C.; Ray, S. C.; Chisari, F. V. (2001): Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. In: *J. Exp. Med* 194 (10), S. 1395–1406.

Thio, C. L.; Gao, X.; Goedert, J. J.; Vlahov, D.; Nelson, K. E.; Hilgartner, M. W.; O'Brien, S. J.; Karacki, P.; Astemborski, J.; Carrington, M.; Thomas, D. L. (2002): HLA-Cw*04 and hepatitis C virus persistence. In: *J. Virol* 76 (10), S. 4792–4797.

Timm J.; Lauer, G. M.; Kavanagh, D. G.; Sheridan, I.; Kim, A. Y.; Pillay, T.; Ouchi, K.; Reyor, L. L.; Zur Schulze Wiesch, J.; Gandhi, R. T.; Chung, R. T.; Bhardwaj, N.; Klenerman, P.; Walker, B. D.; Allen, T. M. (2004): CD8 Epitope Escape and Reversion in Acute HCV Infection. In: *Journal of Experimental Medicine* 200 (12), S. 1593–1604.

Timm J.; Li, B.; Daniels, M. G.; Bhattacharya, T.; Reyor, L. L.; Allgaier, R.; Kuntzen, T.; Fischer, W.; Nolan, B. E.; Duncan, J.; Zur Schulze Wiesch, J.; Kim, A. Y.; Frahm, N.; Brander, C.; Chung, R. T.; Lauer, G. M.; Korber, B. T.; Allen, T. M. (2007): Human leukocyte antigen-associated sequence polymorphisms in hepatitis C virus reveal reproducible immune responses and constraints on viral evolution. In: *Hepatology* 46 (2), S. 339–349.

Uebelhoer, L.; Han, J.-H.; Callendret, B.; Mateu, G.; Shoukry, N. H.; Hanson, H. L.; Rice, C. M.; Walker, C. M.; Grakoui, A.; Moradpour, D. (2008): Stable Cytotoxic T Cell Escape Mutation in Hepatitis C Virus Is Linked to Maintenance of Viral Fitness. In: *PLoS Pathog* 4 (9), S. e1000143.

Wakita, T.; Pietschmann, T.; Kato, T.; Date, T.; Miyamoto, M.; Zhao, Z.; Murthy, K.; Habermann, A.; Krausslich, H. G.; Mizokami, M.; Bartenschlager, Liang, T. J. (2005): Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. In: *Nat Med* 11 (7), S. 791–796.

Walewski, J. L.; Keller, T. R.; Stump, D. D.; Branch, A. D. (2001): Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. In: *RNA* 7 (5), S. 710–721.

Wiese, M.; Berr, F.; Lafrenz, M.; Porst, H.; Oesen, U. (2000): Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C(genotype 1b) single-source outbreak in germany: A 20-year multicenter study. In: *Hepatology* 32 (1), S. 91–96.

- Wiese, M.; Grüngreiff, K.; Güthoff, W.; Lafrenz, M.; Oesen, U.; Porst, H. (2005): Outcome in a hepatitis C (genotype 1b) single source outbreak in Germany--a 25-year multicenter study. In: *J. Hepatol* 43 (4), S. 590–598.
- Wilke, C. O. (2005): Quasispecies theory in the context of population genetics. In: *BMC Evol. Biol* 5, S. 44.
- Xu, Z.; Choi, J.; Yen, T. S.; Lu, W.; Strohecker, A.; Govindarajan, S.; Chien, D.; Selby, M. J.; Ou, J. (2001): Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. In: *EMBO J* 20 (14), S. 3840–3848.
- Yamaga, A. K.; Ou, J.-H. (2002): Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. In: *J. Biol. Chem* 277 (36), S. 33228–33234.
- Yanagi, M.; St Claire, M.; Emerson, S. U.; Purcell, R. H.; Bukh, J. (1999): In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96 (5), S. 2291–2295.
- Yue, G. H.; Bartenschlager, H.; Moser, G.; Geldermann, H. (2000): Identification of QTL affecting important traits on porcine chromosome 12. In: *Yi Chuan Xue Bao* 27 (10), S. 858–865.
- Zeisel, M. B.; Baumert, T. F. (2009): HCV entry and neutralizing antibodies: lessons from viral variants. In: *Future Microbiol* 4 (5), S. 511–517.
- Zeuzem, S.; Andreone, P.; Pol, S.; Lawitz, E.; Diago, M.; Roberts, S.; Focaccia, R.; Younossi, Z.; Foster, G. R.; Horban, A.; Ferenci, P.; Nevens, F.; Müllhaupt, B.; Pockros, P.; Terg, R.; Shouval, D.; van Hoek, B.; Weiland, O.; van Heeswijk, R.; Meyer, S. de; Luo, D.; Boogaerts, G.; Polo, R.; Picchio, G.; Beumont, M. (2011): Telaprevir for retreatment of HCV infection. In: *N. Engl. J. Med* 364 (25), S. 2417–2428.
- Zeuzem, S.; Hultcrantz, R.; Bourliere, M.; Goeser, T.; Marcellin, P.; Sanchez-Tapias, J.; Sarrazin, C.; Harvey, J.; Brass, C.; Albrecht, J. (2004): Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. In: *J Hepatol* 40 (6), S. 993–999.
- Zur Schulze Wiesch, J.; Lauer, G. M.; Timm, J.; Kuntzen, T.; Neukamm, M.; Berical, A.; Jones, A. M.; Nolan, B. E.; Longworth, S. A.; Kasproicz, V.; McMahon, C.; Wurcel, A.; Lohse, A. W.; Lewis-Ximenez, L. L.; Chung, R. T.; Kim, A. Y.; Allen, T. M.; Walker, B. D. (2007): Immunologic evidence for lack of heterologous protection following resolution of HCV in patients with non genotype 1 infection. In: *Blood* 110 (5), S. 1559–1569.

7 Abkürzungsverzeichnis

<i>a.dest</i>	destilliertes Wasser
Abb	Abbildungen
AD	Anti-D
ALT	Alanin-Aminotransferase
APP	Akut-Phase Protein(e)
as	<i>antisense</i>
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
CARDIF	<i>CARD adaptor inducing interferon β</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CLDN-1	Claudin-1
Con1	Replikationsprodukt
CTL	Zytotoxischer T-Zell-Lymphozyt
CTLA-4	Zytotoxisches T-Zell-Lymphozyten Antigen 4
DC	Dendritische Zellen
DC-SIGN	Dendritisch-spezifische intrazelluläre Adhäsionsmoleküle
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbeccos modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
dsRNA	Doppelsträngige RNA
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERAAP	Interferon- γ -induzierbare Aminopeptidase
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein

GT	Genotyp
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HCVpp	HCV Pseudo Partikel
HEPES	N-2hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hIL-2	humanes Interleukin 2
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA	Humanes Leukocyten Antigen
ICS	Intrazelluläre Färbung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-10	Interleukin 10
IPS-I	IFN- β -Promotor Stimulierungsprotein-I
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
ISGs	Interferon stimulierende Gene
JAK	Janus Kinase
JFH-1	<i>Japanese fulminant hepatitis-1</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K	Kontrolle
Kav.	Kavität
KCl	Kaliumchlorid
LDL	<i>low density lipoproteine</i>
L-SIGN	Lymphozyten spezifische intrazelluläre Adhäsionsmoleküle
MAPK	<i>Mitogen-activated protein-Kinase</i>
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaSO ₄	Natriumsulfat
n-syn	Nicht-synonym
NS	Nicht-Strukturprotein
nt	Nukleotid
NTR	<i>Non-translated region</i>

OCLDN-1	Occludin-1
ORF	Offener Leserahmen
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PD-1	<i>Programmed Death 1</i>
PD-L1	<i>Programmed Death Ligand 1</i>
PE	Phycoerithrin
PEG-IFN- α	pegyliertes Interferon- α
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PKR	Protein Kinase R
Pt	Patient
RIG-I	<i>retinoic acid-induced gene I</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase
s	<i>sense</i>
SD	Standardabweichung
SH2	Src-Homologie-Domäne
SOCS3	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
sp	<i>Spacer</i>
SR-B1	<i>scavenger receptor class B type 1</i>
ssRNA	Einzelsträngige Ribonukleinsäure
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
syn	synonym
Tab	Tabelle
TAP	<i>Transporter associated with Antigen Processing</i>
TBE-Puffer	Tris buffered EDTA Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Tris-EDTA
TIM-3	T-Zell Immunglobulin Mucin 3
TLR3	Toll-like Rezeptor 3
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Treg	Regulatorische T-Zelle
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
wt	Wildtyp

7.1 Einheiten

°C	Grad Celsius
μF	Mikro-Farad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
cm	Zentimeter
cpm	<i>counts per minute</i>
h	Stunde
IU	Konversionsfaktor (HCV-RNA Konzentration)
kb	Kilo-Basen
kD	Kilo-Dalton
kHz	Kilohertz
l	Liter
M	Mol
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mV	Milivolt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optical density
pg	Picogramm
pmol	Picomol
rpm	<i>rounds per minute</i>
sec	Sekunde
U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
V	Volumen
W	Watt

8 Anhang

Alignment der Region NS3 (Codon 1027–1366) mit der Konsensussequenz GT 1b und den Konsensussequenzen der verschiedenen Gruppen aus der Anti-D Infektionsquelle.

Konsensus GT 1b	APITAYSQQTRGLLGCIITSLTGRDKNQVEGEVQVVSTAT
Konsensus Gruppe 1
Konsensus Gruppe 2
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	QSFLATCVNGVCWTVYHGAGSKTLAGPKGPITQMYTNVDQ
Konsensus Gruppe 1
Konsensus Gruppe 2F.....
Konsensus Gruppe 3F.....
Konsensus GT 1b	DLVGWQAPPGARSLTPCTCGSSDLYLVRHADVIPVRRRG
Konsensus Gruppe 1P..S.....S.....
Konsensus Gruppe 2P..S.....S.....
Konsensus Gruppe 3P.....S.....
Konsensus GT 1b	DSRGSLLSPRPVSYLKGSSGGPLLCPSGHAVGIFRAAVCT
Konsensus Gruppe 1V.....
Konsensus Gruppe 2V.....
Konsensus Gruppe 3V.....
Konsensus GT 1b	RGVAKAVDFVPVESMETTMRSPVFTDNSSPPAVPQTFQVA
Konsensus Gruppe 1T.....
Konsensus Gruppe 2T.....
Konsensus Gruppe 3T.....
Konsensus GT 1b	HLHAPTGSGKSTKVPAAAYAAQGYKVLVLNPSVAATLGFGA
Konsensus Gruppe 1
Konsensus Gruppe 2S...
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	YMSKAHGVDPNIRTGVRTITTGAPITYSTYGKFLADGGCS
Konsensus Gruppe 1
Konsensus Gruppe 2S.....
Konsensus Gruppe 3S.....
Konsensus GT 1b	GGAYDIIICDECHSTDSTTILGIGTVLDQAETAGARLVVL
Konsensus Gruppe 1S.....
Konsensus Gruppe 2S.....
Konsensus Gruppe 3S.....
Konsensus GT 1b	ATATPPGSVTVPHPNIEEVA
Konsensus Gruppe 1
Konsensus Gruppe 2
Konsensus Gruppe 3

Alignment der Region NS3 (Codon 1361–1650) mit der Konsensussequenz GT 1b und den Konsensussequenzen der verschiedenen Gruppen aus der Anti-D Infektionsquelle.

Konsensus GT 1b	NIEEVALSNTGEIPFYGKAIPETIKGGRHLIFCHSKKKC
Konsensus Gruppe 1
Konsensus Gruppe 2R.....
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	DELAAKLSGLGLNAVAYYRGLDVSVIPTSGDVVVVATDAL
Konsensus Gruppe 1Q.....I.....
Konsensus Gruppe 2Q.....I.....
Konsensus Gruppe 3Q.....I.....
Konsensus GT 1b	MTGFTGDFDSVIDCNCVTQTVDLSLDPFTTETTTVPQD
Konsensus Gruppe 1
Konsensus Gruppe 2
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	AVSRSQRRGRTGRGRRGIYRFVTPGERPSGMFDSSVLCEC
Konsensus Gruppe 1
Konsensus Gruppe 2K.....
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	YDAGCAWYELTPAETSVRLRAYLNTPGLPVCQDHLEFWES
Konsensus Gruppe 1
Konsensus Gruppe 2
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	VFTGLTHIDAHFLSQTKQAGDNFPYLVAYQATVCARAQAP
Konsensus Gruppe 1
Konsensus Gruppe 2
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	PPSWDQMWKCLIRLKPTLHGPTPLLYRLGAVQNEVTLTHP
Konsensus Gruppe 1
Konsensus Gruppe 2
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	ITKYIMACMS
Konsensus Gruppe 1	V.....
Konsensus Gruppe 2	V.....
Konsensus Gruppe 3	V.....

Alignment der Region NS5B (Codon 2368–2876) mit der Konsensussequenz GT 1b und den Konsensussequenzen der verschiedenen Gruppen aus der Anti-D Infektionsquelle.

Konsensus GT 1b	SMSYTWGTGALITPCAAEESKLPINALS
Konsensus Gruppe 2
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT	NSLLRHNNMVYATTSRASQRQKKVTFDRLQVLDDHYRDV
Konsensus Gruppe 2W..
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	LKEMKAKASTVKAKLLSVEEACKLTPPHSARSKFGYGAKD
Konsensus Gruppe 2
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	VRNLSSKAVNHIRSVWKDLLEDTEPTIDTTIMAKNEVFVCV
Konsensus Gruppe 2
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	QPEKGGRKPARLIVFPDLGVRVCEKMALYDVVSTLPQAVM
Konsensus Gruppe 2
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	GSSYGFQYSPGQRVEFLVNAWKSKKCPMGFAYDTRCFDST
Konsensus Gruppe 2K..S.....
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	VTESDIRVEESIQCCDLAPPEARQAIRSLTERLYIGGPLT
Konsensus Gruppe 2
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	NSKGQNCGYRRCRASGVLTTS CGNTLT CYLKASAACRAAK
Konsensus Gruppe 2
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	LQDCTMLVCGDDL VVICESAGTQEDAASLRVFTEAMTRY S
Konsensus Gruppe 2
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	APPGDPPQPEYDLELITSCSSNVSVAH DASGKRVYYLTRD
Konsensus Gruppe 2
Konsensus Gruppe 3
Konsensus GT 1b	PTTPLARAAWETARHTPVNSWLGNIIMYAPTLWARMILMT
Konsensus Gruppe 2V...
Konsensus Gruppe 3V...
Konsensus GT 1b	HFFSILLAQEQLKALDCQIYGACYSIEP
Konsensus Gruppe 2
Konsensus Gruppe 3

8.1 Publikationen

Bengsch B.; Seigel, B.; Ruhl, M.; Timm J.; Kuntz, M.; Blum, H. E.; Pircher, H.; Thimme, R.; Walker, C. M. (2010): Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on Exhausted HCV-Specific CD8⁺ T Cells Is Linked to Antigen Recognition and T Cell Differentiation. In: *PLoS Pathog* 6 (6), S. e1000947.

Ruhl, M.; Knuschke, T.; Schewior, K.; Glavinic, L.; Neumann-Haefelin, C.; Chang, D.-I.; Klein, M.; Heinemann, F. M.; Tenckhoff, H.; Wiese, M.; Horn, P. A.; Viazov, S.; Spengler, U.; Roggendorf; Scherbaum, N.; Nattermann, J.; Hoffmann, D.; Timm J. (2011 a): CD8⁺ T-cell response promotes evolution of hepatitis C virus nonstructural proteins. In: *Gastroenterology* 140 (7), S. 2064–2073.

Ruhl, M.; Chhatwal, P.; Strathmann, H.; Kuntzen, T.; Bankwitz, D.; Skibbe, K.; Walker, A.; Heinemann, F. M.; Horn, P. A.; Allen, T. M.; Hoffmann, D.; Pietschmann, T.; Timm, J. (2011 b): Escape from a dominant HLA-B*15-restricted CD8⁺ T cell response against hepatitis C virus requires compensatory mutations outside the epitope. In: *Journal of virology*.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung eines Viruspartikels.	2
Abbildung 1.2:	Aufbau des HCV-Genoms.	4
Abbildung 1.3:	Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HCV.	6
Abbildung 1.4:	Schematische Darstellung der HCV-Vektoren.	8
Abbildung 1.5:	Schematische Darstellung der Transfektion von Huh7-Zellen mit dem pFK-I389neo/NS3-3'/ET-Vektor.	9
Abbildung 1.6:	Darstellung der Antigenpräsentation im HLA-Klasse I-Peptid-Komplex eines Hepatozyten.	18
Abbildung 2.1:	Schematische Darstellung des Plasmids pFK-I341PI-luc/NS3-3'/Con1/ET.	35
Abbildung 2.2:	Schematische Darstellung des pAcGFP-N1-Vektors.	36
Abbildung 2.3:	Schematische Darstellung des Vektors: pAcGFP-HCV-Flu-A2-HCV.	37
Abbildung 2.4:	Kontingenztafel	52
Abbildung 3.1:	Phylogenetische Analyse der HCV-Sequenzen der NS3 bis NS5B-Region.	54
Abbildung 3.2:	Phylogenetische Analyse von HCV-Sequenzen der NS3-Region.	55
Abbildung 3.3:	Phylogenetische Analysen der HCV-Sequenzen der NS5B-Region.	56
Abbildung 3.4:	Häufigkeit der synonymen und nicht-synonymen Mutationen in den einzelnen Nicht-Strukturproteinen	60
Abbildung 3.5:	Verteilung der HLA-Allele in der Anti-D Kohorte und einer GT 1b Kohorte.	61
Abbildung 3.6:	Schematische Darstellung von HLA-Klasse I-spezifischen CD8-Epitopen.	62
Abbildung 3.7:	Schematische Darstellung der Verteilung der CD8-Epitope im Nicht-Strukturprotein NS3.	64
Abbildung 3.8:	Mutationsrate innerhalb und außerhalb beschriebener HCV-spezifischer CD8-Epitope.	65
Abbildung 3.9:	Identifizierung unbekannter CD8-Epitope	70
Abbildung 3.10:	Ergebnisse der intrazellulären Zytokin-Färbung (ICS) potentieller CD8-Epitope.	72
Abbildung 3.11:	Ergebnisse der intrazellulären Zytokin-Färbung (ICS) der spezifischen HLA-B*15-Epitope.	74

Abbildung 3.12: Statistischer Nachweis des Selektionsdrucks in beschriebenen CD8-Epitopen	76
Abbildung 3.13: Alignment der NS5B-Region 2439-2477 mit den HLA-B*15-spezifischen Epitopen LLRHHNMVY ₂₄₅₀₋₂₄₅₈ und SQRQKKVTF ₂₄₆₆₋₂₄₇₄ .	78
Abbildung 3.14: Dreidimensionale Proteinstruktur von NS5B.	79
Abbildung 3.15: Auswirkung der kompensatorischen Mutationen im HCV-Replikationsassay.	81
Abbildung 3.16: Schematische Darstellung des Vektors: pAcGFP-FLU-A2.	84
Abbildung 3.17: Darstellung der Fluoreszenz-Messung von nicht-transfizierten und transfizierten PBMCs.	85
Abbildung 3.18: Ergebnisse der intrazellulären Zytokin-Färbung nach Ko-Kultur der Effektor- und Zielzellen.	87

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Oligonukleotide	29
Tabelle 2.2:	Peptide	30
Tabelle 2.3:	Anti-D Kohorte Patientenliste	32
Tabelle 2.4:	Patienten mit intravenösem Drogenabusus.	34
Tabelle 2.5:	Pufferansätze	38
Tabelle 2.6:	Medium und Agarplatten zur Kultivierung von <i>E.coli</i> -Bakterien	38
Tabelle 2.7:	Kulturmedium für Huh7-Zellen	39
Tabelle 2.8:	Kulturmedium für PBMCs	39
Tabelle 2.9:	Ansätze und Bedingungen der Reversen Transkription	42
Tabelle 2.10:	Ansätze und Bedingungen der nested-PCR	43
Tabelle 2.11:	Primerkombinationen für die RT-PCR und die nested-PCR.	43
Tabelle 2.12:	Bedingungen im Thermocycler	44
Tabelle 2.13:	<i>in vitro</i> -Transkription	46
Tabelle 2.14:	Die eingesetzten Verdünnungen der Antikörper für die Phenotypisierung der Zellen.	47
Tabelle 2.15:	Beschriebene HCV-spezifische CD8-Epitope in den Nicht-Strukturproteinen NS3 bis NS5B.	49
Tabelle 3.1:	Vergleich der Konsensussequenzen der Infektionsquelle, der Anti-D-Patienten und der allgemeinen GT 1b Konsensussequenz.	57
Tabelle 3.2:	Polymorphismen in Anwesenheit eines spezifischen HLA-Allels in bekannten und möglichen CD8-Epitopen.	67
Tabelle 3.3:	Sechs neue CD8-Epitope.	71
Tabelle 3.4:	Statistischer Nachweis von Selektionen in CD8-Epitopen.	75
Tabelle 3.5:	Werte der Fluoreszenzintensität für GFP	86

8.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Jörg Timm, unter dessen hervorragender Leitung und Betreuung diese Arbeit angefertigt wurde. Seine kontinuierliche Unterstützung, die wertvollen Anregungen und seine stete Diskussionsbereitschaft waren von unschätzbarem Wert.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Professor Dittmer, sowie dem ehemaligen Leiter der Virologie, Herrn Professor Roggendorf für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in den Laboratorien des Institutes für Virologie durchführen zu dürfen.

Ich möchte mich auch bei all denen bedanken, die mich in den letzten Jahren im Laboralltag begleitet haben: Nathalie Gehlmann, die mit ihrer herzlichen und fröhlichen Art den einen oder anderen Nachmittag versüßt hat; Shadi Salloum und Andreas Walker, durch die der Begriff "Klonkrieger" eine ganz andere Bedeutung bekommen hat, und natürlich Lejla Glavinic, Kathrin Skibbe, Christine Thöns, Svenja Groten, Olena Brovko, Sina Luppus, Maren Libskosch und der restlichen HCV-Gruppe, die immer für eine herzliche Stimmung, jede Menge Kuchen und eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Und natürlich geht ein ganz großer Dank an die Mädels Simone Abel, Kathrin Gibbert, Marina Klein, Milena Lange und Susanne Ziegler, die mit Hilfsbereitschaft und Freundschaft für mich da waren.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir mit Liebe, Geduld und Verständnis immer zur Seite standen und auch Familie Wammers, die mit sehr viel Interesse und Unterstützung zu der Fertigung dieser Arbeit beitrugen.

Ganz herzlich danke ich auch Karoline Korpus, durch deren guten Ratschläge und vielen Aufmunterungen manchmal auch ein neues Lebensmotto entstehen kann.

Und zu guter Letzt möchte ich Andre Wammers und Gudrun Mannack für ihre tatkräftige und selbstverständliche Hilfsbereitschaft danken.

8.5 Lebenslauf

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht
enthalten".

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht
enthalten".

8.6 Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Analyse der Interaktion zwischen antiviralen CD8⁺ T-Zellen und der Evolution des Hepatitis C Virus“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Marianne Ruhl befürworte.

Essen, den _____

Prof. Dr. med. Jörg Timm

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Marianne Ruhl

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Marianne Ruhl